

**Chemoenzymatische Synthese von Bacitracin-Derivaten  
und Untersuchungen zur Optimierung der *in vitro*  
Zyklisierung des Surfactins**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Björn Wagner**  
aus Aschaffenburg

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 19.09.2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel (Fachbereich Chemie, Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie, Marburg)

Tag der Disputation: 28.09.2006

*Für Paul und Hermann ...*



## Zusammenfassung

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) sind modular aufgebaute Multienzymkomplexe, die in der Natur für die Synthese einer Vielzahl strukturell diverser Peptide mit bedeutenden pharmakologischen Wirkungsprofilen verantwortlich sind. Ein wichtiges Merkmal vieler dieser Peptide stellen zyklische Strukturen dar, die für die Bioaktivität und Stabilität dieser Naturstoffe essentiell sind. Man unterscheidet bei diesen zyklischen Strukturen zwischen heterozyklischen Ringsystemen, die durch die Kondensation einer Aminosäuren-Seitenkettenfunktion mit dem peptidischen Rückgrat entstehen, und der Erzeugung von Makrozyklen, die im letzten Schritt der Peptidsynthese durch sogenannte Zyklasen (TE-Domänen) gebildet werden. Diese Arbeit beschreibt die Charakterisierung der Bacitracin-Zyklase, welches als PCP-TE-Konstrukt rekombinant produziert werden kann und in der Lage ist, synthetisch hergestellte lineare Bacitracin-Thiophenol-Substrate zu verzweigt-kettigen Makrolaktamen umzusetzen. Durch diesen chemoenzymatischen Ansatz ist es möglich, nicht nur authentisches Bacitracin A herzustellen, sondern die Zyklase auch als molekulares Werkzeug für die Produktion zyklischer Bacitracin A-Derivate zu nutzen. In einem organisch-präparativen Ansatz wurden lineare Bacitracin-Substrate hergestellt, die anstelle des authentischen Thiazolin-Ringes einen Thiazol-, Oxazol-, oder Methyloxazolring enthalten und zu zyklischen Bacitracin-Derivaten umgesetzt werden konnten. Diese synthetisch hergestellten Bacitracin-Derivate wurden auf ihre Bioaktivität getestet und zeigten alle eine antibiotische Aktivität gegen einen repräsentativen Gram-positiven Indikatorstamm. Weiterer Gegenstand dieser Arbeit ist die Etablierung organischer Lösungsmittel oder ionischer Flüssigkeiten als Ersatz für das wässrige Puffer-Milieu der Zyklisierungsreaktion der Surfactin-Zyklase (Srf-TE). Tatsächlich ist diese Zyklase in DMF in der Lage, eine Substrat-Zyklisierung zu katalysieren. Durch diese Aktivität war es zum ersten Mal möglich, eine quantitative Zyklisierung des authentischen Surfactin-Substrates, das N-terminal eine C<sub>14</sub>-Fettsäure enthält, zu erzielen. Auch die Rekonstitution der Zyklisierungseigenschaften einer Srf-TE(P26G)-Mutante konnte in DMF erreicht werden, wodurch die Position des Pro<sub>26</sub> einem spezifischen Oxyanion-Motiv (P-x) zugeordnet werden kann, das in NRPS-Zyklasen konserviert vorliegt. Mutationsstudien im Konsensus-Motiv des nukleophilen Ellenbogens (G-x-S<sub>80</sub>-x-G) ergaben, dass durch Substitution der Oxyanion-Aminosäure Ala<sub>81</sub> mit dem zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Donor Serin, die Zyklisierung einer  $\beta$ -Aminofunktion für die Ausbildung eines zyklischen Surfactin-Laktams (Surfactam) genutzt werden kann.



## Summary

Nonribosomal peptide synthetases (NRPS) are large multienzyme complexes, which are responsible for the synthesis of structurally diverse peptide products that feature distinguished pharmacological profiles. One important structural aspect of many nonribosomal peptides is the introduction of heterocyclic elements into the peptide by the attack of an amino acid side-chain nucleophile onto the peptide backbone. To constrain the peptide into its bioactive conformation, additional macrocyclization can be observed, which is catalyzed in the last step of the biosynthesis by cyclase activity. This work presents a method to selectively alter the heterocyclic metal binding subunit of Bacitracin A by the synthesis of heterocyclic building blocks that have been successfully coupled to the linear decapeptide and subsequently cyclized by the excised bacitracin cyclase. Utilization of this cyclase allowed the first generation of branched cyclic bacitracin derivatives containing thiazole, oxazole, and Methyloxazole moieties. The generated bacitracin derivatives showed bactericidal activity against a representative gram-positive indicator strain, indicating the possibility to alter the biologically important heterocyclic subunit and to overcome existing limitations for the application of bacitracin.

Additional investigations of this work concern the activation of the surfactin cyclase (Srf-TE) in organic solvents or ionic liquids. By this solvent engineering approach it was demonstrated that the catalytic activity of Srf-TE in DMF provides a quantitative method for the *in vitro* cyclization of predominantly hydrophobic surfactin-substrates and eliminates side-product formation caused by hydrolysis. This chemoenzymatic cyclization in DMF was shown for the first time to be a selective method for the cyclization of authentic surfactin carrying a long chain C<sub>14</sub>-fatty acid. The surfactin cyclase inactive mutant (P26G) was restored to full cyclization activity in DMF. This finding led to the identification of an oxyanion-hole consensus motive (P-x), conserved in NRPS cyclases. Mutational studies involving the consensus-motive of the nucleophilic elbow revealed, that substitution of a single amino acid residue (Ala<sub>81</sub>) had tremendous impact on reaction catalysis. Introduction of an additional hydrogen bond donor (Ser<sub>81</sub>) into this position of the primary sequence provided evidence of the molecular recognition of a  $\beta$ -amino-nucleophile and was applied for the production of a cyclic surfactin macrolactam (surfactam).

Der Grossteil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

**B. Wagner, S.A. Sieber, M. Baumann & M.A. Marahiel (2006)**

Solvent Engineering Substantially Enhances the Chemoenzymatic Production of Surfactin. *ChemBiochem*, 7(4), 595-597.

**B. Wagner, D. Schumann, U. Linne, U. Koert & M.A. Marahiel (2006)**

Rational Design of Bacitracin A Derivatives by Incorporating Natural Product Derived Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(32), 10513-10520.

Weitere Publikationen:

**S.A. Samel, B. Wagner, M.A. Marahiel & L.O. Essen (2006)**

The Thioesterase Domain of the Fengycin Biosynthesis Cluster: A Structural Base for the Macrocyclization of a Nonribosomal Lipopeptide. *J. Mol. Biol.*, 359(4), 876-889.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Nichtribosomale Peptidsynthese	4
2.1.1	Die Adenylierungs(A)-Domäne	5
2.1.2	Die Kondensations(C)-Domäne	6
2.1.3	Die Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP-Domäne)	8
2.1.4	Die Termination der Peptidsynthese	9
2.1.5	Modifizierende Domänen	12
2.1.6	Postsynthetische Modifikationen	14
2.1.7	Die Lipid-Initiation	14
2.2	Die enzymatische Zyklusbildung in NRPS	15
2.2.1	Die Heterozyklisierung in NRPS	15
2.2.2	Die Makrozyklisierung	18
2.2.3	Die $\alpha/\beta$ -Faltungsstruktur der NRPS-Zyklasen	21
2.3	Nichtribosomale Peptide	25
2.3.1	Das Peptidantibiotikum Bacitracin	25
2.3.2	Die Lipopeptide des <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.3.3	Die chemoenzymatische Peptidzyklisierung	29
2.4	Biotechnologische Manipulation enzymatischer Katalyse	31
2.4.1	Die Evolution der Enzyme	31
2.4.2	Die Biokatalyse in nichtwässrigem Milieu ( <i>Solvent Engineering</i> )	32
2.5	Aufgabenstellung	35
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>36</b>
3.1	Geräte	36
3.2	Chemikalien, Enzyme, Laborprodukte	37
3.3	Vektoren	38
3.3.1	pQE60	38
3.3.2	pREP4	39
3.4	Mikroorganismen	40
3.4.1	<i>E. coli</i> XL1-Blue	40
3.4.2	<i>E. coli</i> Top 10	40
3.4.3	<i>E. coli</i> BL21( $\Delta$ DE3)	40

---

3.4.4	<i>E. coli</i> M15 .....	40
3.4.5	<i>B. subtilis</i> PY79.....	40
3.5	Medium.....	41
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>42</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	42
4.1.1	Konstruktion von pQE60[bac-pcp-te].....	42
4.1.2	Konstruktion der Plasmide für die Srf-TE Mutationsanalysen.....	42
4.2	Proteinchemische Methoden .....	43
4.2.1	Genexpression.....	43
4.2.2	Zellaufschluss .....	44
4.2.3	Ni <sup>2+</sup> -NTA Affinitätschromatographie .....	44
4.2.4	Gelfiltration .....	45
4.2.5	Lyophilisation .....	45
4.3	Chemische Methoden .....	46
4.3.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen .....	46
4.3.2	Festphasen-Peptid-Synthese (SPPS) .....	46
4.3.3	Synthese der SNAC- und Thiophenol-Thioester .....	49
4.3.4	Synthese der Bacitracin Dipeptid Bausteine .....	50
4.4	Biochemische Methoden.....	57
4.4.1	Assay der Zyklisierungs-Reaktion .....	57
4.4.2	Assay der Zyklisierungs-Reaktion in organischen Lösungsmitteln .....	57
4.4.3	Assay der Zyklisierungs-Reaktion in ionischen Flüssigkeiten.....	58
4.4.4	Bestimmung der kinetischen Parameter der Zyklisierungs-Reaktion ..	58
4.4.5	Semi-Präparative Synthese der zyklischen Bacitracin-Derivate .....	59
4.4.6	Biologische Aktivitätsbestimmung .....	59
4.5	Analytische Methoden.....	59
4.5.1	Allgemeine analytische Methoden .....	59
4.5.2	Massenspektrometrie .....	60
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>62</b>
5.1	Die chemoenzymatische Entwicklung neuer Bacitracin-Derivate .....	63
5.1.1	Produktion der Bacitracin PCP-TE Didomäne.....	63
5.1.2	Die Zyklisierungsreaktion der Bac-PCP-TE.....	64
5.1.3	Untersuchungen zur Substrat-Spezifität der Bac-PCP-TE.....	69
5.1.4	Die chemoenzymatische Bacitracin A Synthese .....	71

---

5.1.5	Die chemoenzymatische Synthese der Bacitracin-Derivate .....	73
5.1.6	Die Bioaktivität der Bacitracin-Derivate .....	75
5.2	Die chemoenzymatische Surfactin Produktion .....	78
5.2.1	Die Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters .....	78
5.2.2	Die Aktivität der NRPS-Zyklasten in organischen Lösungsmitteln .....	79
5.2.3	Die Zyklisierungsreaktion der Srf-TE in ionischen Flüssigkeiten .....	86
5.3	Die chemoenzymatische Makrolaktam-Bildung der Srf-TE .....	89
5.3.1.	Die Nukleophilie der Surfactin-Substrate.....	91
5.3.2	Rationales Protein Design der Srf-TE .....	91
5.3.3	Die chemoenzymatische Surfactam Produktion in DMF .....	97
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>98</b>
6.1	Die Derivatisierung des Bacitracins .....	98
6.1.1	Der Einfluss des Heterozyklus auf die Zyklisierungsreaktion.....	99
6.1.2	Der Einfluss des Heterozyklus auf die Bioaktivität .....	101
6.1.3	Der Einfluss des Substrates auf die Zyklisierungsreaktion .....	102
6.2	Solvent Engineering .....	104
6.2.1	Die Position P26 in der Srf-TE.....	106
6.3	Das Rationale Srf-TE Design.....	108
6.3.1	Die Verwandtschaft der Lipopeptid-Zyklasten.....	109
6.3.2	Einfluss der Basizitätsveränderung auf die Laktambildung.....	110
6.3.3	Die Position des Substrat-Nukleophils .....	111
6.3.4	Der Einfluss der Abgangsgruppe auf die Surfactam-Bildung.....	114
6.3.5	Die Perspektive chemoenzymatischer Zyklisierungsreaktionen .....	115
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>130</b>



# 1 Abkürzungen

A-Domäne	Adenylierungs-Domäne
ACP	<i>acyl-carrier</i> -Protein
Amp <sup>n</sup>	Ampicillin (n µg/mL)
AMT-Domäne	Aminotransferase-Domäne
Äqui.	Äquivalent
ATP	Adenosine-5'-triphosphat
AS	Aminosäure
ATCC	Stammsammlung ( <i>American Type Culture Collection</i> )
Bac	Bacitracin
<i>bla</i>	Ampicillin-Resistenz-Kassette
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
bp	Basen Paare
C-Domäne	Kondensations-Domäne
CDA	<i>Calcium dependent antibiotic</i>
CoA	Coenzym A
Cy-Domäne	Heterozyklisierungs-Domäne
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DHB	2,3 Dihydroxybenzoat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-Domäne	Epimerisations-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronen-Spray-Ionisierung
FAS	Fettsäuresynthase
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FPLC	schnelle Flüssigkeitschromatographie
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotron-Resonanz
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

---

HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
IPTG	Isoprenyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid
Kan <sup>n</sup>	Kanamycin (n $\mu$ g/mL)
LB Medium	Luria-Bertani Medium
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MCS	Multipler Klonierungsbereich (multiple cloning site)
MHK	Minimale Inhibitorische Konzentration
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear magnetic resonance
N-Mt-Domäne	N-Methylierungs-Domäne
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriacetat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
<i>ori</i>	Replikationsursprung
Ox-Domäne	Oxidations-Domäne
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCP	<i>peptidyl carrier</i> Protein
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKS	Polyketid Synthase
Ppan	4'-Phosphopanthethein
R-Domäne	Reduktase-Domäne
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SNAC	N-Acetylcysteamine
SPPS	Peptid-Festphasen-Synthese ( <i>solid phase peptide synthesis</i> )
tBu	<i>tert</i> -Butyl
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TE-Domäne	Thioesterase-Domäne
TFA	Trifluoroessigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
trt	Trityl
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Tabelle 1.1: Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben- Code	1-Buchstaben- Code	Molekulargewicht (g/mol)
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cysteine	Cys	C	121
2,3-Diaminobutyrat	Dab		118
Glutamin	Gln	Q	146
Glutamat	Glu	E	147
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Homoserin	Hse		119
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valine	Val	V	117

## 2 Einleitung

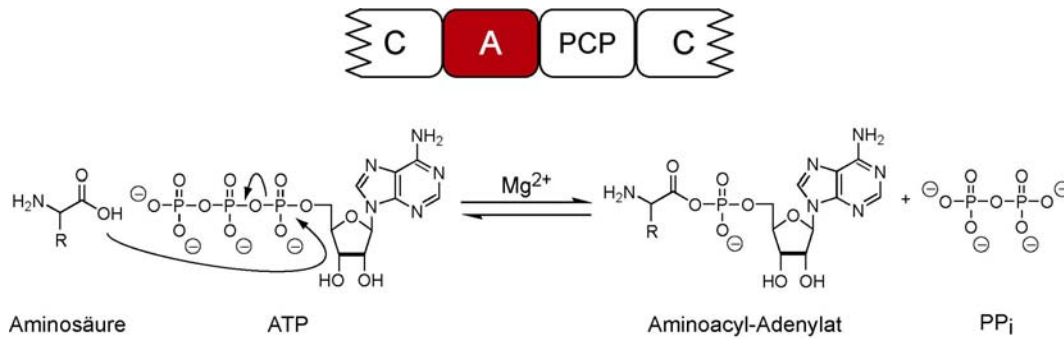
### 2.1 Nichtribosomale Peptidsynthese

Filamentöse Pilze und Bakterien unterschiedlicher Gattungen produzieren bioaktive Peptide, die eine große Gruppe von pharmakologisch interessanten Naturstoffen mit hoher Strukturvielfalt repräsentieren. Sie finden zahlreiche Anwendung in Medizin, Landwirtschaft und biochemischer Forschung. Gemäß ihrer natürlichen Synthese können sie als ribosomal und nichtribosomal synthetisierte Peptide klassifiziert werden. Letztere stellen den weitaus größten Anteil bekannter bioaktiver Peptide.<sup>[1]</sup> Aufgrund der speziellen Eigenschaften multifunktionaler nichtribosomaler Peptidsynthetasen (NRPS) kann die hohe strukturelle Vielfalt erklärt werden, die in einer nukleinsäureabhängigen ribosomalen Synthese nicht zu erreichen wäre.<sup>[2]</sup> Es handelt sich bei den in dieser Arbeit untersuchten nichtribosomalen Peptidsynthetasen um Multienzymkomplexe von beachtlicher Größe, die gleichzeitig das Templat und die Biosynthese-Maschinerie darstellen (siehe Abb. 2.1). Sie weisen eine modulare Organisation auf, wobei man unter einem Modul einen Abschnitt auf der Polypeptidkette der NRPS versteht, der für die Inkorporation und Modifikation einer Carboxysäure (meist Aminosäure) verantwortlich ist.<sup>[3]</sup> Die vorhandenen Module können weiter in Domänen unterteilt werden, die die eigentlichen katalytischen Einheiten des NRPS darstellen. Innerhalb ihrer Gruppe zeigen die Domänen unterschiedlich hohe Homologien, besitzen allerdings hochkonservierte Bereiche, die so genannten *Core-Motive*, die zu deren Identifizierung dienen können.<sup>[4]</sup> Die einfachste Zusammensetzung eines NRPS-Moduls besteht aus mindestens drei Domänen (A-Domäne, C-Domäne, PCP-Domäne), die essentiell für die erfolgreiche Aktivierung, Kondensation und den Transport der Monomere über die Synthetase sind. Die jeweils ersten Module eines NRPS-Systems beinhalten oft keine C-Domäne und werden als Initiationsmodul bezeichnet, wohingegen sich das letzte Modul (Terminationsmodul) dadurch auszeichnen kann, dass eine terminale Thioesterase-Domäne die Abspaltung des Peptids vom Templat katalysiert. Modifizierungen des Peptides können durch zusätzlich integrierte oder freistehende Modifikations-Domänen erzielt werden.<sup>[5]</sup> Neben der linearen Peptidsynthese sind auch Biosynthesesysteme bekannt, in denen die vorhandenen Module iterativ genutzt werden, oder eine nichtlineare Domänenabfolge zeigen.<sup>[1]</sup>



### 2.1.1 Die Adenylierungs(A)-Domäne

5



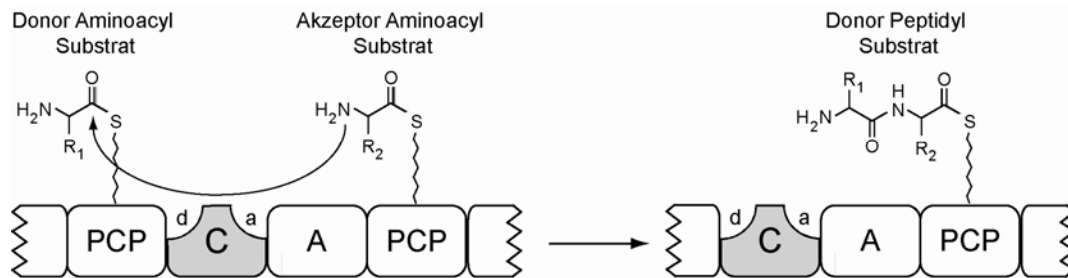
**Abb. 2.1.1: Die Substrat-Aktivierung der Adenylierungs-Domäne:** Die A-Domäne erkennt spezifisch die Substrat-Aminosäure und aktiviert diese in Gegenwart von ATP und  $\text{Mg}^{2+}$  als Aminoacyl-Adenylat unter Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat.

A-Domänen bestehen aus ungefähr 550 Aminosäuren,<sup>[7]</sup> für die durch Sequenzvergleiche eine bis zu 60%ige Homologie nachgewiesen werden konnte. Zehn *Core-Motive* konnten identifiziert werden, die in allen bekannten A-Domänen zu finden sind. Deren Aminosäure-Reste, die die Bindung des ATPs und die Erkennung der Substrat-Aminosäure übernehmen, lassen eine Vorhersage über die Selektivität der A-Domänen zu und führten zur Entwicklung des nichtribosomalen Codes.<sup>[8]</sup> Durch gezielte Mutationen dieser Aminosäuren konnte eine Veränderung der Substrat-Spezifität einzelner A-Domänen erzielt werden.<sup>[9]</sup> Eine interessante Besonderheit bilden freistehende A-Domänen, die häufig in der Biosynthese von Siderophoren zu finden sind und Arylsäuren aktivieren.<sup>[10]</sup>

### 2.1.2 Die Kondensations(C)-Domäne

Für die Knüpfung der Peptidbindung in der nichtribosomalen Peptidsynthese sind die ungefähr 450 Aminosäuren umfassenden Kondensations-Domänen verantwortlich. Diese Domänen katalysieren den nukleophilen Angriff der  $\alpha$ -Aminogruppe der *downstream* PCP-gebundenen Akzeptor-Aminosäure auf das Thioester-Carbonyl-C-Atom der *upstream* gebundenen Donor-Aminosäure.<sup>[11]</sup> Die resultierende verlängerte Peptidkette ist nun als aktivierter Thioester auf der *downstream* gelegenen PCP-Domäne gebunden, und kann als Donor-Peptidyl-Substrat für die nächste Elongationsreaktion dienen (siehe Abb. 2.1.2).

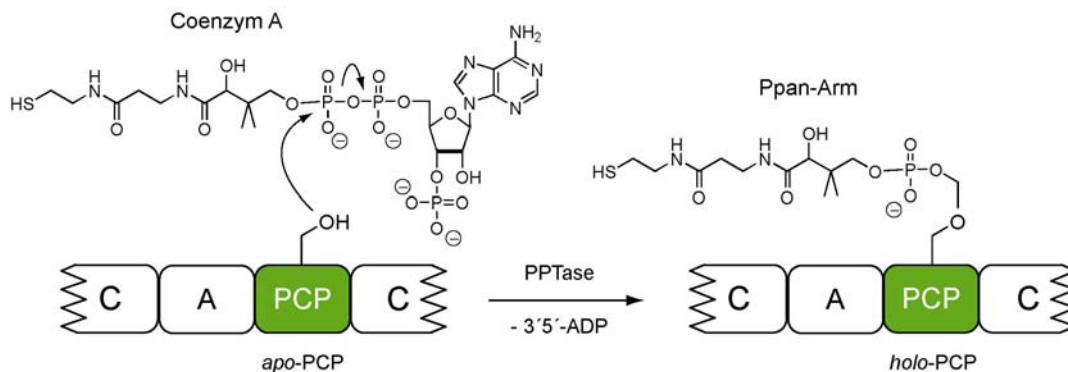
Die Direktionalität der Peptidsynthese wird durch zwei Unterdomänen innerhalb der C-Domäne, die sich strukturell wenig unterscheiden, gesichert. Diese Unterdomänen werden analog zu ihrer Koordination der gebundenen Substrate als Akzeptor(a)- und Donor(d)-Position bezeichnet. Die v-förmige Anordnung der beiden Untereinheiten zueinander, stellt die Zugänglichkeit der Substrate zum katalytischen Zentrum der C-Domäne von beiden Seiten sicher.<sup>[12]</sup> Die Akzeptor-Position der C-Domäne besitzt eine intrinsische Spezifität für das PCP-gebundene Aminoacyl-Nukleophil des eigenen Modules. Diese Spezifität ist zwar nicht so stark ausgeprägt wie bei der Aminosäure-Aktivierung der A-Domänen, hat aber einen entscheidenden Anteil an der Kontrolle der Elongationsreaktion. Die C-Domäne diskriminiert hierbei nicht nur zwischen den Enantiomeren des präsentierten Substrates, sondern erkennt auch Veränderungen der Seitenkette. Ein konservierter Histidinrest im katalytischen Zentrum der C-Domänen ermöglicht die selektive Deprotonierung der  $\alpha$ -Aminogruppe des Akzeptor-Substrates und erhöht somit deren Nukleophilie für die Peptidbindungsknüpfung.<sup>[13]</sup> Im Biosynthesesystem des Lipopeptides Arthrofactin können die enthaltenen C-Domänen, zusätzlich zu ihrer Kondensationsreaktion, auch die Epimerisierung der Aminosäuren übernehmen.<sup>[14]</sup>



**Abb. 2.1.2: Die Kondensationsreaktion:** Die Peptidbindungsknüpfung wird in der nichtribosomalen Peptidsynthese durch C-Domänen katalysiert. Durch den nukleophilen Angriff der in der Akzeptor-Position (a) koordinierten Aminosäure auf einen, sich in der Donor-Position (d) befindenden Aminoacyl- oder Peptidyl-Rest, kommt es zur Kettenverlängerung.

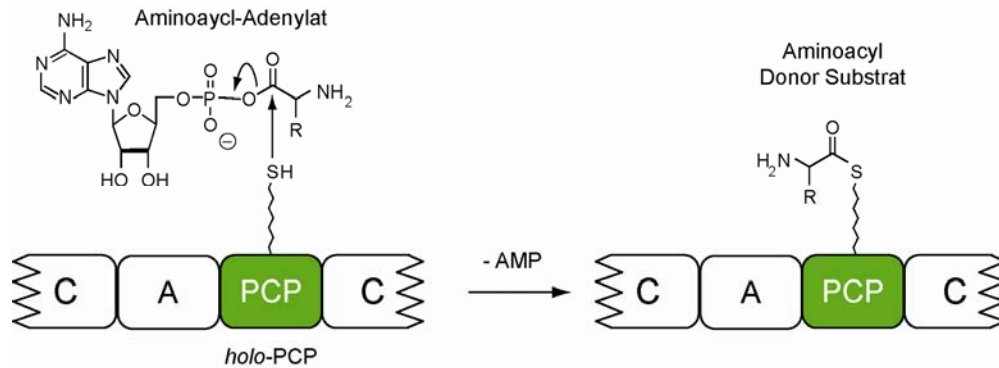
### 2.1.3 Die Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP-Domäne)

Das Peptidyl-Carrier Protein (PCP) ist das zentrale Transportprotein der nichtribosomalen Peptidsynthetasen und hat die Aufgabe, die aktivierten Substrate und Synthese-Intermediate für die aktiven Zentren der angrenzenden katalytischen Domänen zugänglich zu machen. PCP-Domänen bestehen aus ungefähr 80 Aminosäuren und besitzen keine katalytische Aktivität.<sup>[15]</sup> Die Transformation des inaktiven *apo*-PCPs in die aktive *holo*-Form resultiert aus einer posttranslationalen Modifikation, in der ein ungefähr 20 Å langer 4'-Phosphopanthethein-Kofaktor (Ppan-Arm) auf einen hochkonservierten Serinrest des PCPs übertragen wird. Bei dieser Transformation (*Priming*) erfolgt der nukleophile Angriff der Hydroxylgruppe des Serins auf die  $\beta$ -Phosphatgruppe eines Coenzym A (CoA), der durch eine 4'-Phosphopanthethein-Transferase (PPTase) katalysiert wird (Abb. 2.1.3).<sup>[16]</sup>



**Abb. 2.1.3: Posttranslationale Modifikation der PCP-Domäne:** Die PPTase katalysiert die Modifikation der *apo*-PCP-Domäne in ihre aktive *holo*-Form. Dabei wird die 4'-Phosphopanthethein-Einheit des CoAs auf das konservierte Serin der PCP-Domäne übertragen.

Die von der angrenzenden A-Domäne aktivierte Aminosäure kann nun unter Abspaltung von AMP als reaktiver Thioester kovalent auf den Ppan-Arm übertragen und so zu den katalytischen Zentren der benachbarten Domänen transportiert werden (siehe Abb. 2.1.4).

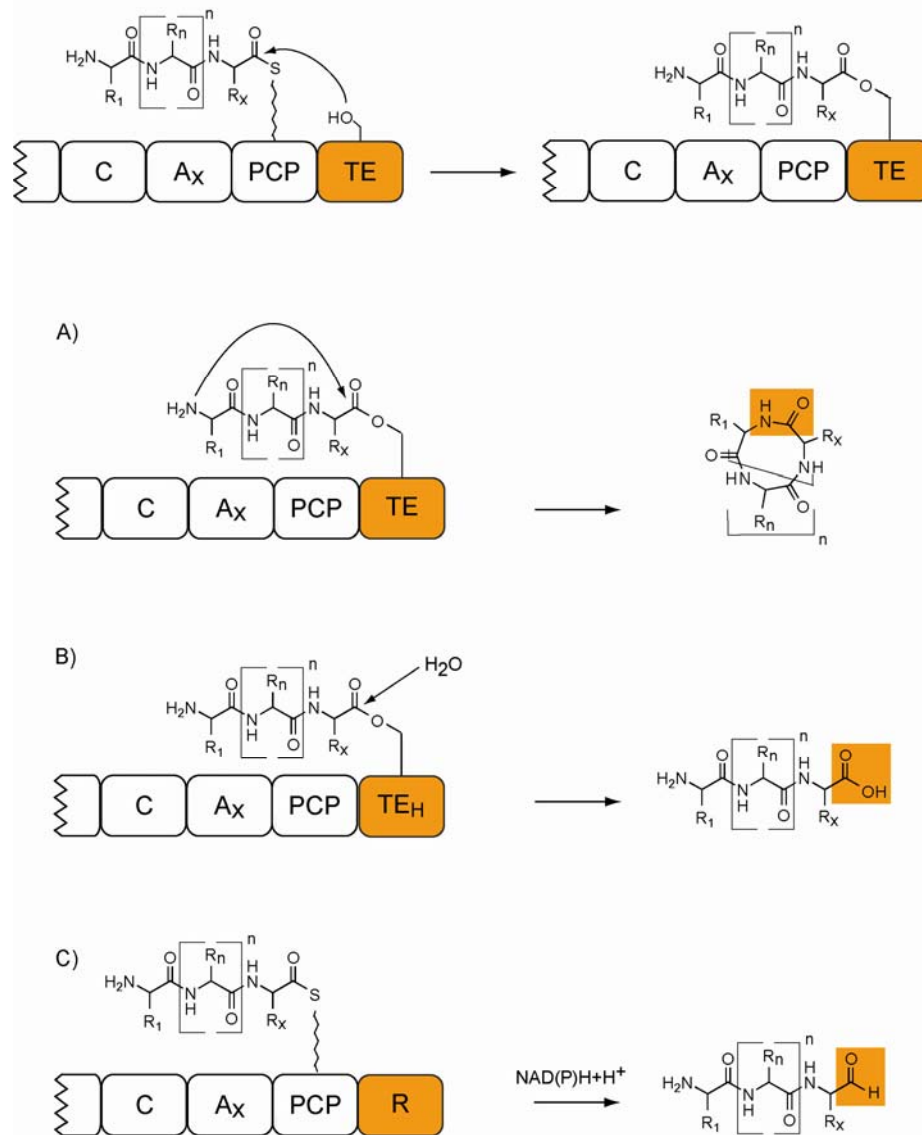


**Abb. 2.1.4: Beladung der PCP-Domäne:** Die von der A-Domäne als Aminoacyl-Adenylat aktivierte Aminosäure wird unter Abspaltung von AMP kovalent als Thioester auf den 4'-PP-Kofaktor der *holo*-PCP-Domäne übertragen.

Anhand von NMR-Studien wurde bewiesen, dass PCP-Domänen durch diese posttranslationale Modifikation ihre Konformation ändern.<sup>[17]</sup> Erst diese dynamische Konformationsänderung ermöglicht die Interaktion des Ppan-Armes mit den angrenzenden katalytischen Domänen. Da einige PPTasen eine breite Substratspezifität besitzen, kann es dazu kommen, dass auch Acyl-CoA-Derivate, die in großer Anzahl für die Fettsäuresynthese hergestellt werden, als Substrate akzeptiert werden. Die dabei entstehenden acylierten Synthetasen können durch einen Kontrollmechanismus von externen Typ II-Thioesterasen (TE II) erkannt werden. Diese sind in der Lage, fehlbeladene PCP-Domänen zu reaktivieren indem sie die Synthetase vom falsch gebundenen Substrat befreien und der Peptidsynthese wieder zugänglich machen.<sup>[18]</sup>

#### 2.1.4 Die Termination der Peptidsynthese

Der letzte Schritt der nichtribosomalen Peptidsynthese besteht in der Abspaltung des vollständig synthetisierten Peptides vom Enzym-Templat.<sup>[19]</sup> Hierbei werden verschiedene Strategien zur Freisetzung des Peptidproduktes verwendet (siehe Abb. 2.1.5).



**Abb. 2.1.5: Verschiedene Mechanismen der Peptidfreisetzung:** Zunächst wird die Peptidkette auf das katalytisch aktive Serin des aktiven Zentrums der Zyklase übertragen. Der dabei entstehende Oxoester kann durch verschiedene Mechanismen, die zur Freisetzung des Peptides führen, gespalten werden. (A) Die am häufigsten beobachtete Peptidfreisetzung wird von Zyklasen katalysiert die den Angriff eines internen Nukleophiles auf das Carbonyl-C-Atom des Acyl-O-TE Intermediates ermöglichen und dabei ein makrozyklisches Produkt freisetzen. (B) Hydrolasen (TE<sub>H</sub>) erlauben die Peptidfreisetzung durch Angriff von Wasser auf die Oxoesterbindung und die Freisetzung eines linearen Peptides (freie Peptidsäure) (C) Alternativ zur TE-katalysierten Freisetzung können C-terminale Reduktase-Domänen (R) in einer NAD(P)H-abhängigen Reduktionsreaktion den C-Terminus des PCP-gebundenen Peptides zum linearen Peptid-Aldehyd oder Peptid-Alkohol umsetzen und diesen dadurch freisetzen.

In den meisten bakteriellen Systemen wird die Termination der Peptidsynthese durch Domänen katalysiert, die aufgrund ihrer Homologie zu den Thioesterasen des Fettsäurestoffwechsels als Thioesterase-Domänen (TE-Domäne) klassifiziert wurden.<sup>[18, 20]</sup> Auch in der humanen Fettsäuresynthese ist eine solche Thioesterase beschrieben worden, die eine Freisetzung der Fettsäuren von der FAS katalysiert.<sup>[21]</sup> In den unterschiedlichen nichtribosomalen Biosynthesesystemen können Thioesterase-Domänen verschiedene Reaktionen katalysieren. So findet man besonders häufig Thioesterasen, die eine Makrozyklisierung des synthetisierten Peptides durch einen intramolekularen Ringschluss katalysieren und die analog zu dieser Zyklisierungsreaktion als Zyklasen bezeichnet werden.<sup>[22]</sup> Da sich ein großer Teil dieser Arbeit mit diesen Zyklasen befasst, ist ihnen ein gesondertes Kapitel (siehe Kapitel 2.2.2) gewidmet.

Neben der Freisetzung zyklischer Produkte kann die Abspaltung des Peptides vom Templat aber auch durch Hydrolyse erfolgen. Die Thioesterase (TE<sub>H</sub>) katalysiert hierbei nicht die Makrozyklisierung des Peptides, sondern setzt die lineare Peptidsäure durch Hydrolyse des auftretenden Acyl-O-TE Oxoesters frei, wie dieses im Falle der Biosynthese der Glykopeptid-Antibiotika (z.B. Vancomycin, Teicoplanin oder Balhimycin) und des Siderophors Yersiniabactin zu beobachten ist.<sup>[23, 24]</sup>

In einigen fungalen NRPS, wie beispielsweise der Cyclosporin-Synthetase, ist die TE-Domäne durch eine spezielle Kondensations-Domäne ersetzt, die ebenfalls eine Makrozyklisierung des Peptides katalysieren kann.<sup>[25]</sup> Außer diesen Möglichkeiten kann das Peptid auch durch Reduktion der C-terminalen  $\alpha$ -Carboxyl-Gruppe zum entsprechenden Aldehyd oder Alkohol von der Synthetase gespalten werden. Diese durch NAD(P)H-abhängige Reduktasen katalysierte Reaktion kann in der Biosynthese des linearen Gramacidins, des Myxochelins und des Nostocyclopeptides beobachtet werden.<sup>[26-28]</sup> Der freigesetzte Aldehyd des Nostocyclopeptides stellt hierbei nur eine Zwischenstufe auf dem Weg zu einem zyklischen Imin dar.

Die Freisetzung des Peptides ist außerdem auch durch *in trans* katalysierende TE-Domänen möglich. Im Biosynthesesystem des Mannopectimycins ist keine TE-Domäne zur Peptidfreisetzung im terminalen Modul enthalten und das PCP-gebundene Peptid wird hierbei durch eine freistehende TE-Domäne von der Synthetase abgespalten.<sup>[29]</sup>

### 2.1.5 Modifizierende Domänen

Abgesehen von NRPS-Domänen, die essentiell für die Peptidsynthese sind, wurden zusätzliche Domänen identifiziert, die Modifikationen des Peptidgerüsts katalysieren und somit die strukturelle Vielfalt der nichtribosomalen Peptide wesentlich erhöhen (siehe Abb. 2.1.6).<sup>[5]</sup>

Eine häufige Besonderheit nichtribosomaler Peptide ist der Einbau von D-Aminosäuren.<sup>[4]</sup> E-Domänen katalysieren hierfür die Racemisierung des C $_{\alpha}$ -Atoms des PCP-gebundenen Aminoacyl- beziehungsweise Peptidyl-Substrates durch dessen Deprotonierung und Reprotonierung.<sup>[30]</sup> Häufig sind E-Domänen am C-terminalen Ende einer Synthetase zu finden und sind an der spezifischen Erkennung der Synthetasen untereinander, über kleine helikale Kommunikationsvermittelnde Einheiten (COM-Domänen), beteiligt.<sup>[31]</sup>

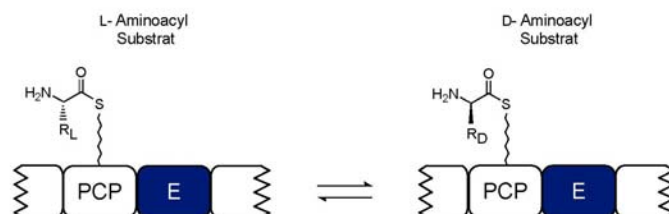
Für den Einbau N-methylierter Aminosäuren sind N-Methylierungs(N-Mt)-Domänen verantwortlich. Sie katalysieren den Transfer der S-Methyl-Gruppe ihres Kosubstrates S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf die  $\alpha$ -Aminogruppe des PCP-gebundenen Aminoacyl-Substrates.<sup>[32]</sup> Auch N-Methylierung der gebildeten Heterozyklen können beobachtet werden.<sup>[33]</sup> Es finden sich allerdings nicht nur N-Methylierungen. Eine C-Methylierungs(C-Mt)-Domäne ist aus der Biosynthese des Yersiniabactins bekannt, die eine selektive Methylierung des  $\alpha$ -C-Atoms des Cystein-Restes katalysiert und durch die anschließende Aktivität einer Cy-Domäne die Ausbildung eines  $\alpha$ -Methyl-Thiazolin-Rings ermöglicht.<sup>[34]</sup>

Die Oxidationsstufen der in nichtribosomalen Peptiden vorgefundenen Heterozyklen (siehe Kapitel 2.2.1) wird durch FMN-abhängige Oxidations(Ox)-Domänen, die eine Zwei-Elektronen-Oxidation der dihydroaromatischen Thiazolin-, beziehungsweise Oxazolin-Ringe ermöglichen, katalysiert.<sup>[35]</sup> Auch die Reduktion der Heterozyklen zu den entsprechenden tetrahydrierte Thiazolidine und Oxazolidine ist möglich.<sup>[36]</sup> Die Reduktionskatalyse erfolgt dabei durch freistehende NAD(P)H-abhängige Reduktasen, die *in trans* das PCP-gebundene Substrat erkennen und zum entsprechenden tetrahydrierten Heterozyklus umsetzen.<sup>[37]</sup>

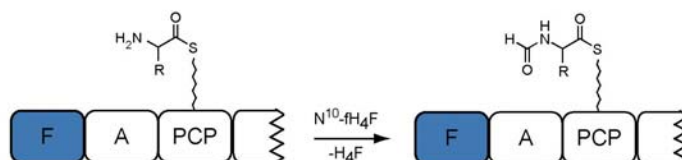
In der Biosynthese des linearen Gramacidins und des Anabaenopeptilides findet man zusätzlich im Initiationsmodul eine sogenannte F-Domäne, die eine N-Formylierung des Peptides, durch Übertragung der Formylgruppe ihres Kofaktors, katalysiert.<sup>[38, 39]</sup>



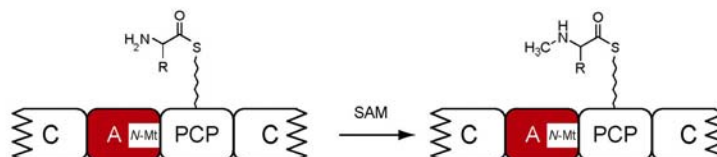
## A) Epimerisation-Domäne



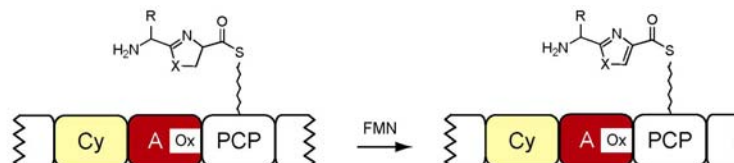
## B) Formylierungs-Domäne



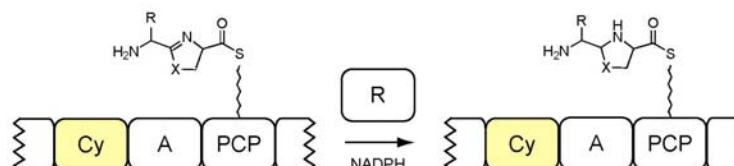
## C) N-Methylierungs-Domäne



## D) Oxidations-Domäne



## E) Reduktions-Domäne



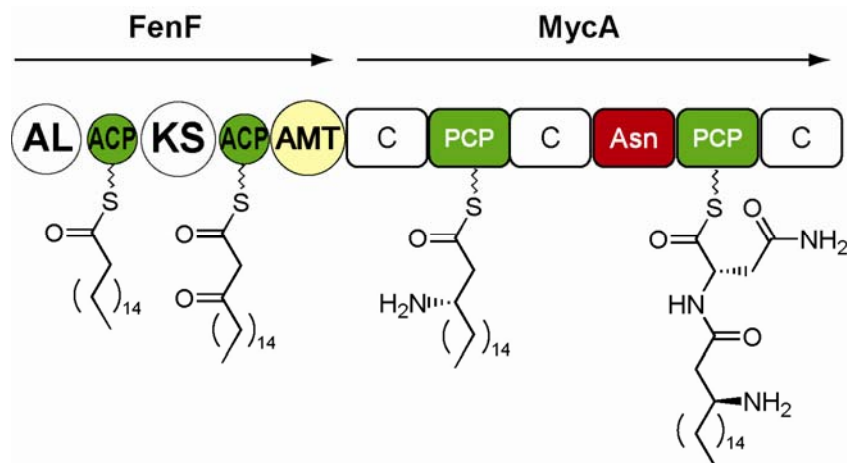
**Abb. 2.1.6: Modifizierende Domänen in NRPS:** (A) Die E-Domäne katalysiert die Einstellung des Gleichgewichtes der Epimere eines PCP-gebundenen Aminoacyl-Substrates. (B) F-Domänen katalysieren die Übertragung der Formylgruppe des Kofaktors  $N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat auf die freie Aminofunktion der ersten aktivierten Aminosäure. (C) N-Mt-Domänen katalysieren die SAM-abhängige Methylierung der PCP-gebundenen Aminosäure. (D) Die Oxidations-Domänen katalysieren die FMN-abhängige Oxidation der dihydroaromatischen Heterozyklen zu den entsprechenden Heteroaromaten. (E) Externe Reduktasen können in einer NAD(P)H-abhängigen Reaktion das PCP-gebundene Substrat zum entsprechenden Thiazolidinen oder Oxazolidinen reduzieren.

### 2.1.6 Postsynthetische Modifikationen

Zusätzlich zu den erwähnten Veränderungen während der Peptidsynthese, können nichtribosomale Peptide in einigen Fällen auch noch nach der Freisetzung durch postsynthetisch wirkende Enzyme modifiziert werden. Die Gene dieser Enzyme sind üblicherweise im selben Biosynthese-Cluster zu finden und ihre Aktivität ist für die Bioaktivität der Peptide von entscheidender Bedeutung. Ein Beispiel dieser postsynthetischen Modifikationen ist die Kondensation von Zucker-Einheiten auf die Seitenkettenfunktionen des Peptides.<sup>[40, 41]</sup> Aber auch Halogenierungen, Hydroxylierungen oder oxidative Verbrückungen werden beobachtet.<sup>[5, 42]</sup>

### 2.1.7 Die Lipid-Initiation

Eine große Anzahl von nichtribosomalen Peptiden trägt N-terminal eine langkettige Fettsäure. Sie verleiht dem Peptid einen amphiphilen Charakter und ist häufig für dessen Interaktion mit Zellmembranen verantwortlich. Die korrespondierenden Synthetasen besitzen in ihrem Initiationsmodul eine zusätzliche N-terminale C-Domäne, die eine Bindung zwischen der Fettsäure und der ersten Aminosäure katalysiert.<sup>[43]</sup> Es wird vermutet, dass eine Fettsäure-Acyl-AMP-Ligase (FAAL) dabei die gewünschte Fettsäure, ähnlich der Aminosäuren-Aktivierung der A-Domänen, als Fettsäure-Adenylat aktiviert, wie dieses für das *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben wurde.<sup>[44]</sup> Diese aktivierte Fettsäure könnte anschließend auf den Ppan-Arm eines externen Acyl-Carrier-Proteins (ACP) übertragen werden und dieses mit der N-terminalen C-Domäne des Initiationsmodules interagieren. In der Biosynthese des Lipopeptides Mycosubtilin muss zusätzlich zu dieser Lipid-Initiation eine Aminofunktion in  $\beta$ -Position der Fettsäure integriert werden. Dieses wird durch ein gemischtes PKS/NRPS Hybrid-System der ersten Synthetase ermöglicht (siehe Abb. 2.1.7).<sup>[45]</sup> Ein freistehendes Acyl-Carrier-Protein überträgt auch hierbei die gewünschte C<sub>14</sub>-Fettsäure auf die Acyl-CoA-Ligase des ersten PKS-Moduls. Die transferierte Fettsäure wird innerhalb des Modules weiteren Modifikationen unterzogen, wobei eine Keto-Funktion in  $\beta$ -Position der Fettsäure entsteht, die anschliessend durch eine Aminotransferase(AMT)-Domäne in eine  $\beta$ -Aminofunktion prozessiert wird.<sup>[46]</sup> Die entstehende  $\beta$ -Amino-Fettsäure stellt in der Klasse der Iturin-Lipopeptide die makrozyklische Laktambildung sicher.



**Abb. 2.1.7: Der postulierte Mechanismus der Mycosubtilin Lipid-Initiation und Prozession:** Die gewünschte C<sub>14</sub>-Fettsäure wird wahrscheinlich als Fettsäure-Adenylat aktiviert und auf die Acyl-CoA-Ligase (AL-Domäne) des NRPS/PKS-Hybridsystems übertragen. Die Ketosynthase (KS) des Moduls könnte in β-Position der Fettsäure eine Ketofunktion einführen, die anschließend durch eine Aminotransferase-Domäne (AMT) zu einer β-Aminofunktion umgesetzt würde. Die prozessierte Fettsäure kann nun auf den NRPS-Teil der Synthetase übertragen und an die erste aktivierte Aminosäure (L-Asn) gekuppelt werden.

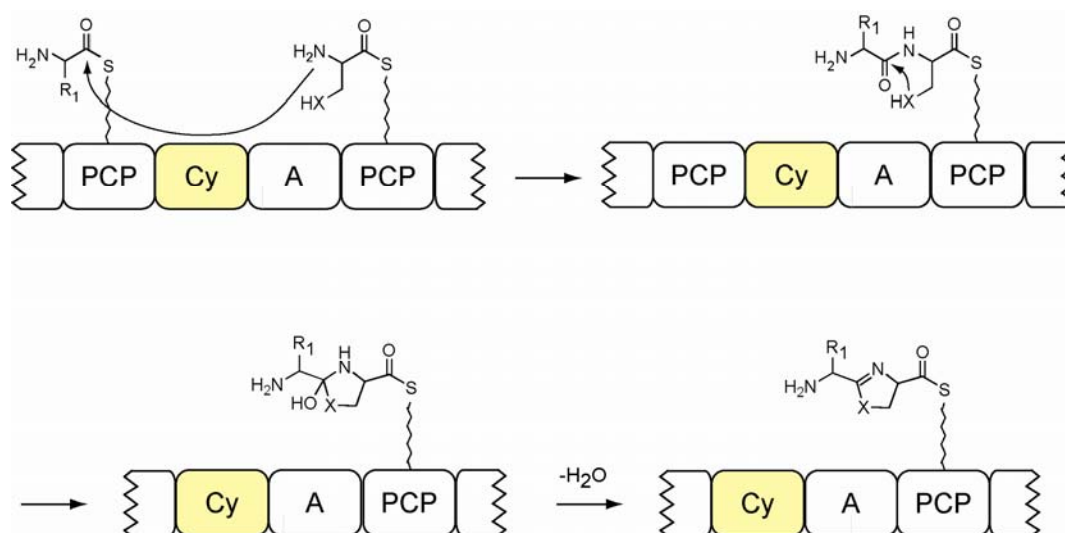
## 2.2 Die enzymatische Zyklusbildung in NRPS

Die herausragende Besonderheit nichtribosomaler Peptide ist das Auftreten zyklischer Strukturen. Man unterscheidet hierbei die Integration kleiner fünfgliedriger heterozyklischer Ringe in das Rückgrat des Peptides von der Zyklisierung des gesamten Peptides zu einem makrozyklischen Produkt. Durch diese Zyklisierungsstrategien erhalten die Peptide ihre biologisch-aktive Konformation und ermöglichen spezifische Interaktionen mit ausgewiesenen molekularen Zielen.<sup>[22]</sup>

### 2.2.1 Die Heterozyklisierung in NRPS

Eine besondere Modifikation des Peptidrückgrates ist die Bildung heterozyklischer Ringe, die in vielen bioaktiven Naturstoffen peptidischer Herkunft zu finden sind (siehe Abb. 2.2.2). Bedingt durch die heterozyklischen Strukturen besitzen diese Verbindungen interessante biologische Eigenschaften, wie

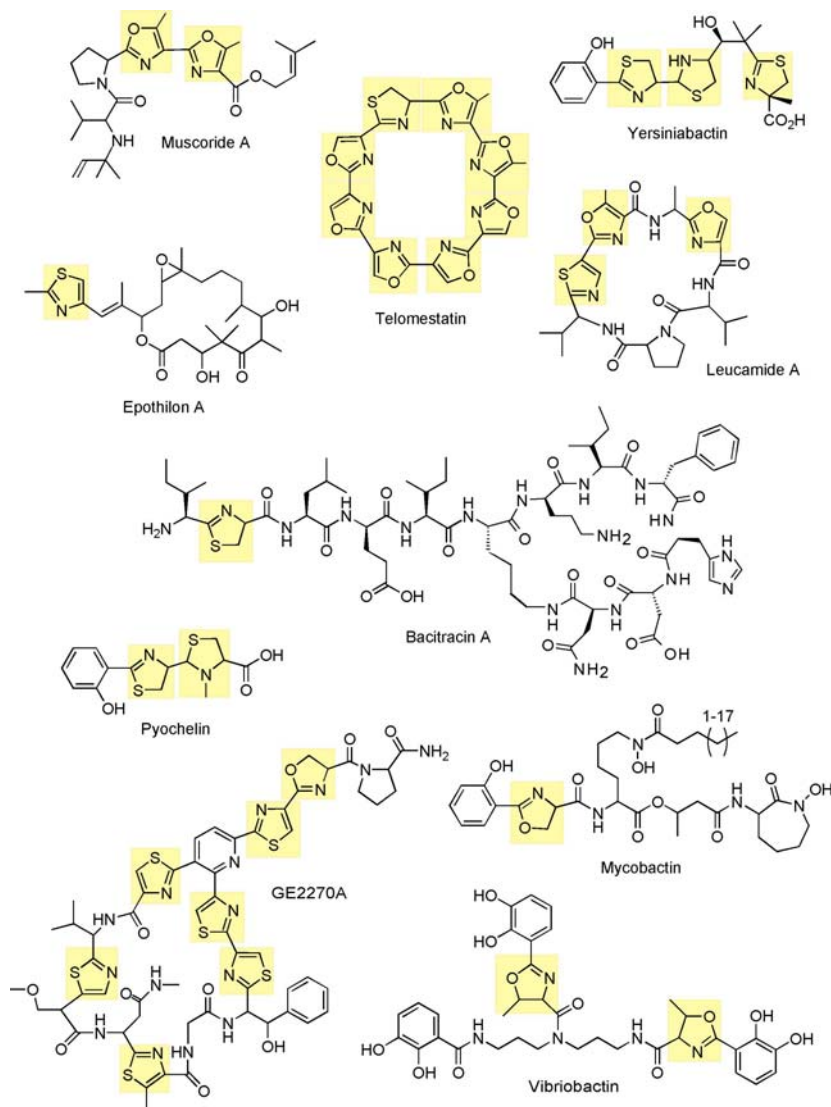
beispielsweise die Möglichkeit zur Chelatisierung von Metallionen oder die Interaktion mit DNA-Zielmolekülen. Heterozyklische Ringe sind deshalb besonders häufig in Siderophoren und marinen Sekundärmetaboliten zu finden.<sup>[47, 48]</sup> Die Bildung dieser heterozyklischen Ringe unterliegt den Zyklisierungs(Cy)-Domänen, die in Cystein-, Serin- oder Threonin-aktivierenden Modulen die C-Domäne ersetzen. Zusätzlich zur Kondensationsreaktion können diese Cy-Domänen den nukleophilen Angriff des Heteroatoms der Aminosäure-Seitenketten auf das  $\alpha$ -Carbonyl-C-Atom der vorangehenden Aminosäure katalysieren. Durch die nachfolgende Dehydratisierung bilden sich die dihydroaromatische Heterozyklen (siehe Abb. 2.2.1).<sup>[49]</sup>



**Abb. 2.2.1: Die Reaktion der Zyklisierungs-Domäne:** Die Cy-Domäne katalysiert analog zur Kondensationsreaktion der C-Domäne, eine Verknüpfung der PCP-gebundenen Aminoacyl-Substrate und zusätzlich einen Ringschluss durch den nukleophilen Angriff des Heteroatoms der Seitenketten auf das Peptidrückgrat. Im letzten Schritt wird durch Dehydratisierung der Thiazolin- oder Oxazolin-Ring gebildet.

Je nach aktivierter Aminosäure kann man die resultierenden Heterozyklen in Thiazolin-Ringe, die durch Cystein-aktivierende Module gebildet werden, und Oxazolin-Ringe, die durch die Aktivierung von Serin- oder Threonin-Resten entstehen, unterteilen. Thiazolin-Ringe findet man zum Beispiel im Peptid-Antibiotikum Bacitracin<sup>[50]</sup> und im Siderophor Yersiniabactin,<sup>[34]</sup> Oxazoline sind Bestandteile des Vibriobactins und des Mycobactins.<sup>[33, 51]</sup> Die integrierten Heterozyklen können weiteren Modifikationen unterworfen werden (siehe Kapitel

2.1.5) Eine weitere Möglichkeit der Integration fünfgliedriger Heterozyklen in nichtribosomale Peptide wurde in den Biosynthesesystemen der Coumarin-Antibiotika beobachtet. Hier wird Prolin durch eine *in trans* katalysierende A-Domäne aktiviert und auf eine freistehende PCP-Domäne übertragen. Durch die anschließende Aktivität einer Dehydrogenase entsteht ein Pyroll-2-Carboxylat, das als Baustein verwendet werden kann.<sup>[52, 53]</sup>



**Abb. 2.2.2: Bioaktive heterozyklische Naturstoffe:** Alle Oxidationsstufen der fünfgliedrigen Heterozyklen (gelb) treten in nichtribosomal und gemischt PKS/NRPS erzeugten Peptiden auf. Gezeigt sind Muscoride A aus *Nostoc muscorum*, Telomestatin (*Streptomyces anulatus*), Yersiniabactin (*Yersinia pestis*), Epothilon A (*Sorangium cellulosum*), Leucamide A (*Leucetta microraphis*), Bacitracin A (*Bacillus icheniformis*), Pyochelin (*Pseudomonas aeruginosa*), Mycobactin (*Mycobacterium tuberculosis*), GE2270A (*Planobispora rosea*) und Vibriobactin (*Vibrio cholerae*).

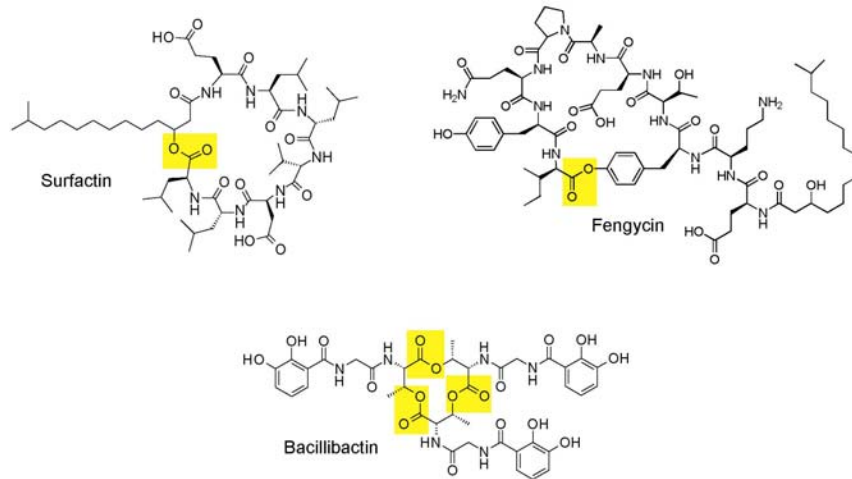
### 2.2.2 Die Makrozyklisierung

Alle bis heute untersuchten Zyklisierungen nichtribosomaler Peptide werden durch C-terminal im Terminationsmodul vorkommende Zyklastasen (Thioesterase-Domäne, TE-Domäne) katalysiert. Dabei lässt sich anhand der erzeugten zyklischen Produkte, makrozyklische Laktame oder Laktone, eine Einteilung dieser Zyklisierungsreaktion vornehmen (siehe Abb. 2.2.3).

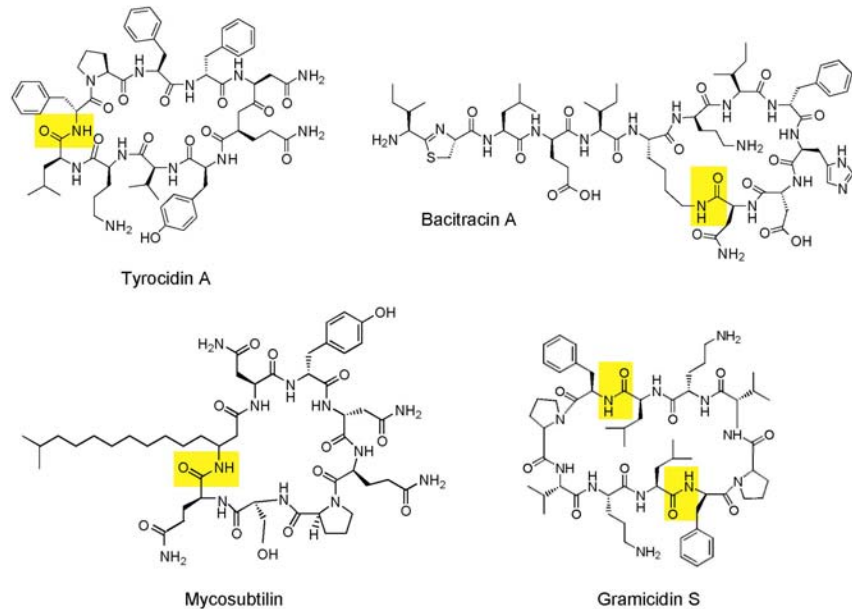
Der in Makrolaktonen beobachtete Ringschluss kann entweder über die  $\beta$ -Hydroxyl-Funktion einer vorhandenen Fettsäure, oder über die Hydroxyl-Funktion eines Serins, Threonins oder Tyrosins katalysiert werden. Die Zyklastase des Lipopeptides Surfactin (Srf-TE) katalysiert beispielsweise den Angriff des Hydroxyl-Nukleophiles der (*R*)- $\beta$ -OH-Fettsäure auf den intermediär ausgebildeten Acyl-O-TE Oxoester. Hierdurch wird das Lipo-verzweigte Surfactin freigesetzt.<sup>[54]</sup> Im Gegensatz hierzu, findet im Lipopeptid Fengycin der Angriff der Hydroxyl-Funktion einer Tyrosin-Seitenkette auf den Oxoester statt. Die Fengycin Zyklastase (Fen-TE) diskriminiert das N-terminal vorhandene  $\beta$ -Hydroxyl-Nukleophil, der ebenfalls vorhandenen Fettsäure, und setzt das Aminosäure-verzweigt-kettige Produkt Fengycin frei.<sup>[55, 56]</sup> Die spezielle Regiospezifität der NRPS-Zyklastasen wird an diesem Beispiel besonders deutlich, da im Fengycin-Substrat eine große Anzahl an alternativen Nukleophilen vorhanden ist, allerdings spezifisch nur die Hydroxyl-Funktion der Tyrosin-Seitenkette für den Ringschluss erkannt wird.

Zusätzlich zu der makrozyklischen Laktambildung findet man in nichtribosomalen Peptiden auch makrozyklische Laktame. Ähnlich wie bei den Makrolaktonen können unterschiedliche Zyklusbildungen beobachtet werden. Man findet so genannte Kopf-zu-Schwanz Zyklisierungen, wie zum Beispiel im Peptidantibiotikum Tyrocidin, in denen die N-terminale Aminogruppe den Acyl-O-TE Oxoester angreift und ein zyklisches Laktam ausbildet.<sup>[57]</sup> Man findet allerdings auch verzweigt-kettige Laktame, die durch den Angriff der Aminogruppe einer Aminosäure-Seitenkette auf den Acyl-O-TE Oxoester entstehen. Im Peptidantibiotikum Bacitracin führt der Angriff der Aminofunktion des Lysins<sub>6</sub> zur Ausbildung der „Lasso“-Struktur des Dodecapeptides.<sup>[49]</sup> Zusätzlich findet man auch Makrolaktame, die über eine  $\beta$ -Aminofunktion einer Fettsäure ausgebildet werden. Die Zyklastase des antifugalen Lipopeptides Mycosubtilin (Myc-TE) katalysiert den regiospezifischen Angriff der  $\beta$ -Aminofunktion der C<sub>14</sub>-Fettsäure auf das Carbonyl-C-Atom des Oxoesters.

### A) Makrolaktone



### B) Makrolaktame



### Abb. 2.2.3: Die Makrozyklisierungs-Strategien nichtribosomaler Zyklasten:

A) Nichtribosomale Zyklasten können makrozyklische Laktone ausbilden. Gezeigt sind das Lipo-verzweigte Surfactin, das Aminosäure-verzweigte Fengycin und das iterativ erzeugte Siderophor Bacillibactin. B) Die makrozyklische Laktambildung ist am Beispiel des „Kopf-zu-Schwanz“ zyklisierten Tyrocidins, des Aminosäure-verzweigten Bacitracins, des Lipo-verzweigten Mycosubtilins und des iterativ erzeugten Dilaktams Gramicin S dargestellt. Die Zyklisierungspositionen sind dabei gelb unterlegt.

Wie im bereits erwähnten Surfactin ist auch hier die  $\beta$ -Position der Fettsäure an der Zyklisierung des Substrates beteiligt.<sup>[45]</sup> Während in beiden Fällen die Vorstufe aus dem Primärstoffwechsel der Fettsäuresynthese stammt, muss im Fall der Surfactin-Biosynthese diese mit einer  $\beta$ -Hydroxyl-Funktion ausgestattet werden, um ein Lipo-verzweigtes Lakton ausbilden zu können. Im Fall des Mycosubtilin wird zusätzlich in  $\beta$ -Position der Fettsäure eine Aminofunktion eingeführt und somit die zyklische Makrolaktam-Bildung ermöglicht (siehe Kapitel 2.1.6).<sup>[58]</sup> In beiden Fällen benutzt die Natur also identische Vorläufer, die durch Biosynthese-Enzyme modifiziert werden um unterschiedliche Produkt herstellen zu können. Die natürliche Diversität der peptidischen Makrolaktame und Makrolaktone kann durch Oligomerisierung der Peptidmonomere zusätzlich erweitert werden.<sup>[59]</sup> Diese iterative Strategie ermöglicht in der Biosynthese des Gramacidin S die Zyklodimerisierung zweier linearer Pentapeptide zum zyklischen Dilaktam.<sup>[60]</sup> Aber auch Zyklotrimerisierungen wurden beschrieben. Durch die Verknüpfung dreier 2,3-Dihydroxybenzoyl-Glycyl-Threonyl-Monomere kann die optimale  $\text{Fe}^{3+}$ -Bindungs-struktur des Siderophors Bacillibactin ausgebildet werden.<sup>[61, 62]</sup>

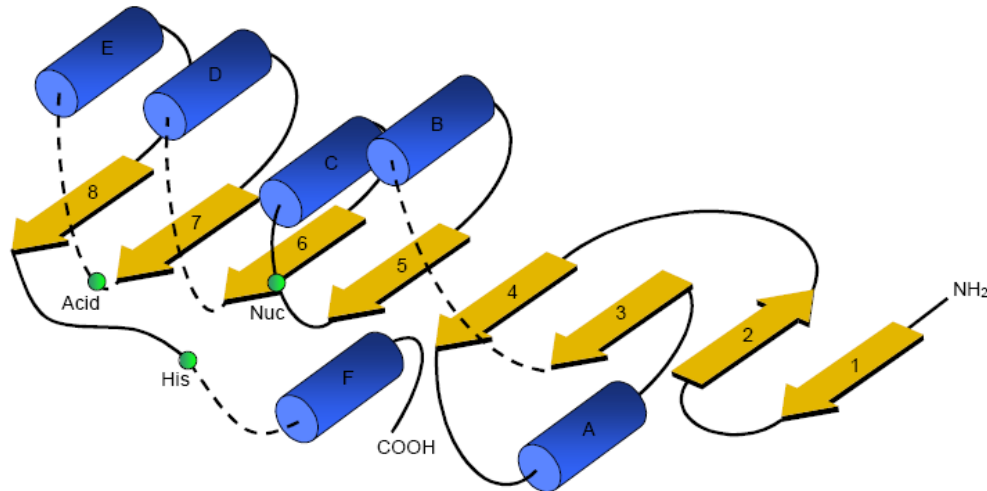
Die dreidimensionale Struktur der Zyklasen lässt Rückschlüsse über Regiospezifität und Stereoselektivität des akzeptierten Nukleophils zu und erlaubt außerdem den Ausschluss von Wasser, der zu einer ungewünschten Nebenreaktion führen würde. Kristallographische Daten freistehender Zyklasen lieferten erste strukturelle und mechanistische Einblicke<sup>[63, 64]</sup> und zeigten dabei die Verwandtschaft der Zyklasen mit Mitgliedern der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen-Superfamilie, die im folgenden Kapitel 2.2.3 beschrieben wird.



## 2.2.3 Die $\alpha/\beta$ -Faltungsstruktur der NRPS-Zyklasten

### 2.2.3.1 Die Enzymfamilie der $\alpha/\beta$ -Hydrolasen

Die Familie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen stellt eine der größten Proteinfamilien der Natur mit unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften dar.<sup>[65]</sup> Die Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen zwar keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten auf, besitzen dennoch alle ein gemeinsames Faltungsmotiv. Außer den in dieser Arbeit beschriebenen NRPS-Zyklasten sind in dieser Proteinfamilie Vertreter wie Esterasen, Hydrolasen, Peroxidasen, Proteasen, Lyasen oder Lipasen vertreten. Die strukturelle Architektur der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen stellt ein typisches Beispiel einer in der Natur häufig angenommenen Tertiärstruktur dar, deren Vertreter sich im Zuge der Evolution wahrscheinlich aus einem gemeinsamen enzymatischen Vorläufer entwickelt haben.<sup>[66]</sup> Die kanonische  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen Faltung (siehe Abb. 2.2.4) besteht aus einem Kern von acht überwiegend parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblatt-Strängen, die an beiden Seiten von  $\alpha$ -helikalen-Bereichen umschlossen sind. Dieses stabile Gerüst erlaubt die Ausbildung einer aktiven Tasche, in der sich die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren befinden. Das katalytische Nukleophil kann in einem als nukleophiler Ellenbogen bezeichneten spezifischen Sequenz-Motiv G-x-Nu-x-G (Nu = Serin, Cystein oder Aspartat) lokalisiert werden. Unter physiologischen Bedingungen wäre die Hydroxyl-Funktion eines Serin-Nukleophils chemisch inert. Durch die unmittelbare Nähe eines basischen Histidin-Restes erfolgt jedoch die Deprotonierung des Serins, dessen nukleophiler Charakter dadurch deutlich ansteigt. Dieses Serin ist nun in der Lage, einen bereits in der Bindungstasche über Van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisierten Substratester anzugreifen. Der durch die Serin Deprotonierung entstehende positiv geladene Imidazolring des Histidins wird seinerseits durch elektrostatische Wechselwirkungen mit einem negativ geladenen Aspartat stabilisiert. Das Zusammenspiel dieser katalytisch wichtigen Aminosäuren wird auch als katalytische Triade bezeichnet. Eine wichtige Komponente des katalytischen Mechanismus der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ist die erstmals für Serin-Proteasen postulierte Oxyanion-Bindungstasche (*Oxyanion hole*).<sup>[67]</sup> Diese beschreibt eine Umgebung von zwei wohl definierten Wasserstoffbrückendonoren (Amidgruppen des Peptidrückgrates), die für die Stabilisierung des während der Reaktion intermediär auftretenden, negativ geladenen Carbonylsauerstoffanions des



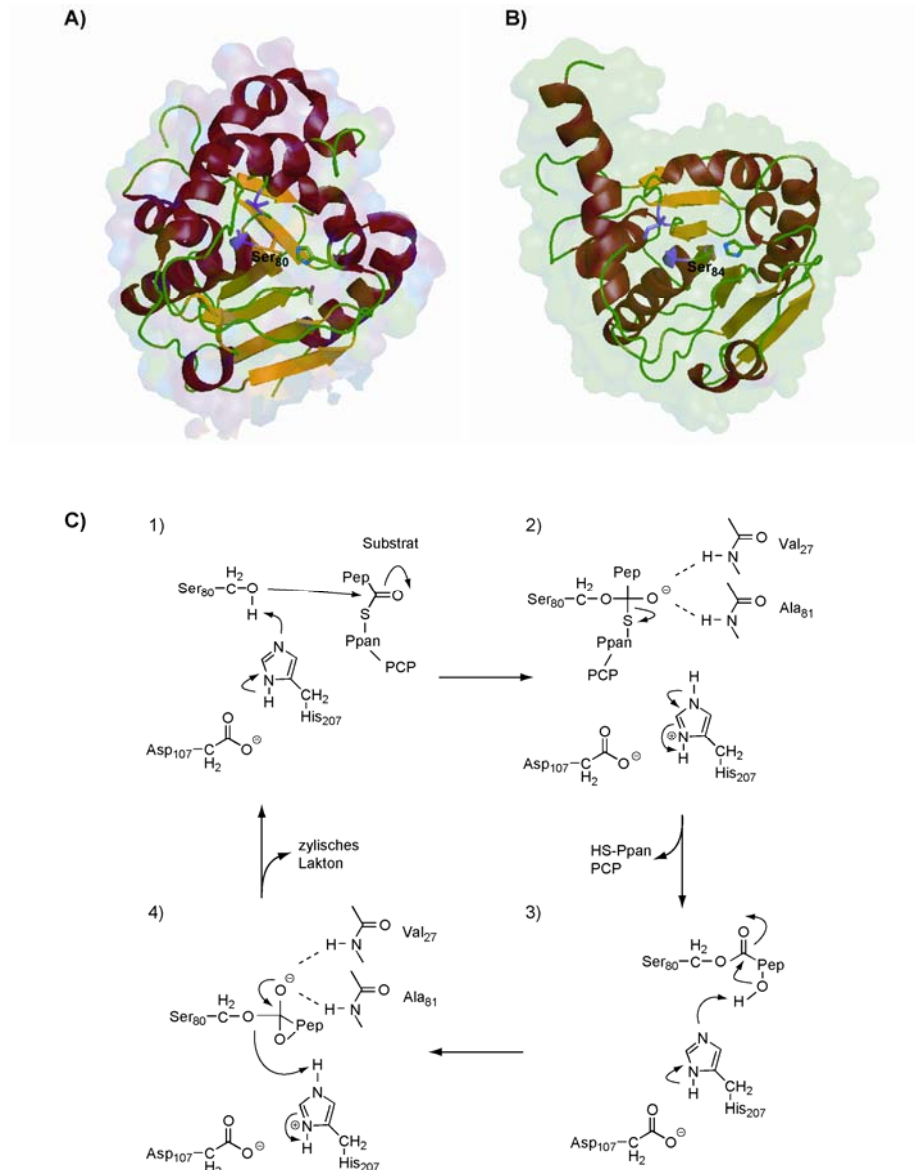
**Abb. 2.2.4: Schematische Darstellung der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen Faltungsstruktur:**  $\alpha$ -helikale Bereiche sind als blaue Zylinder dargestellt,  $\beta$ -Stränge als gelbe Pfeile. Die gestrichelten Linien deuten variable Bereiche an. Der nukleophile Ellenbogen befindet sich zwischen  $\beta 5$  und  $\alpha C$ . Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade sind als grüne Punkte dargestellt.

Acyl-O-TE Oxoester Intermediates zuständig sind (siehe Abb. 2.2.5C). Eine dieser beiden Oxyanion-Aminosäuren befindet sich im strukturell konservierten nukleophilen Ellenbogen und folgt direkt dem katalytisch aktiven Nukleophil (G-x-S-x-G), während die andere Oxyanion-Aminosäure in einem Loop-Bereich (Strang  $\beta 3$ ) zu finden ist. Anhand der Position dieser zweiten Oxyanion-Aminosäure konnten Konsensus-Motive identifiziert werden, die eine nähere Klassifizierung der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen zuließen.<sup>[68]</sup> Die Architektur dieser Konsensus-Motive erlaubt die Unterteilung in drei Klassen: G-x-Motiv, G-G-G-x-Motiv und Y-Motiv (die Position der Oxyanion-Aminosäure ist rot markiert).

### 2.2.3.2 Struktur und Mechanismus der NRPS-Zyklasten

Nichtribosomale Zyklasten sind globuläre Enzyme, die im freien Raum eine Dimension von ungefähr  $(40\text{\AA})^3$  ausbilden und die typischen Strukturmerkmale der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen aufweisen. Strukturanalysen der Surfactin-Zyklase (Srf-TE) zeigten, dass das Enzym eine Fass-ähnliche Struktur ausbildet, in der die aktive Tasche beherbergt ist.<sup>[63, 64]</sup> Die in dieser aktiven Tasche vorliegende katalytische Triade setzt sich in der Surfactin-Zyklase aus den Aminosäuren Ser<sub>80</sub>, His<sub>207</sub> und Asp<sub>107</sub> (Fen-TE: Ser<sub>84</sub>, His<sub>201</sub> und Asp<sub>111</sub>) zusammen (siehe Abb. 2.2.5). Das katalytisch aktive Serin befindet sich hierbei im Konsensus-Motiv G-x-S-x-G des nukleophilen Ellenbogens und erlaubt den nukleophilen Angriff auf das PCP-gebundene Peptidyl-Substrat. Die Strukturanalyse der Srf-TE ergab zwei unterschiedliche Konformationen, die sich im Wesentlichen in der Lage eines etwa 50 Aminosäuren langen Proteinabschnittes unterscheiden. Dieser Abschnitt ist der flexibelste des Enzyms und liegt wie ein Deckel (Lid-Bereich) über der aktiven Tasche.

Durch die kristallographischen Daten war es möglich, einen Katalysemechanismus für die Zyklisierungsreaktion zu postulieren. Bei dieser Reaktion müssen zwei Teilschritte unterschieden werden.<sup>[69]</sup> Der erste Schritt besteht in der Erkennung und Übertragung des Substrates auf die Hydroxyl-Funktion des aktiven Serins. Diese Peptidacylierung wird durch den Mechanismus der katalytischen Triade ermöglicht. Kokristallographische Studien mit einem Borsäure-Inhibitor, der mit dem aktiven Serin der katalytischen Triade eine kovalente Bindung ausbildet zeigten, dass die Zyklaste die Konfiguration der C-terminalen Aminosäuren L-Leu<sub>7</sub> und D-Leu<sub>6</sub> des Peptides erkennt.<sup>[54]</sup> Das bei der Acylierung auftretende negativ geladene Oxyanion wird durch zwei Wasserstoff-Brücken-Donoren, die eine Ausbildung der Oxyanionbindungstasche ermöglichen (Srf-TE: Val<sub>27</sub> und Ala<sub>81</sub>; Fen-TE Ile<sub>30</sub> und Ala<sub>85</sub>), im tetraedrischen Übergangszustand stabilisiert. Durch die Acylierung entsteht als Zwischenstufe der Katalyse ein Acyl-O-TE Oxoester, der im zweiten Schritt durch den regiospezifischen und stereospezifischen intramolekularen Angriff eines Peptid-Nukleophils gespalten wird. Durch diesen intramolekularen Ringschluss werden makrozyklische Produkte freigesetzt (siehe Abb. 2.2.5C).



### Abb. 2.2.5: Struktur und Mechanismus der NRPS-Zyklasten:

A) Kristallstruktur der Srf-TE Domäne. Helices sind in rot abgebildet,  $\beta$ -Stränge in gelb. Die katalytisch wichtige Triade (Ser<sub>80</sub>, His<sub>207</sub>, Asp<sub>107</sub>) ist durch Stick-Darstellung hervorgehoben, die Oxyanion-Aminosäuren magenta. B) Kristallstruktur der Fen-TE Domäne. Hervorgehobene Aminosäuren wie oben.

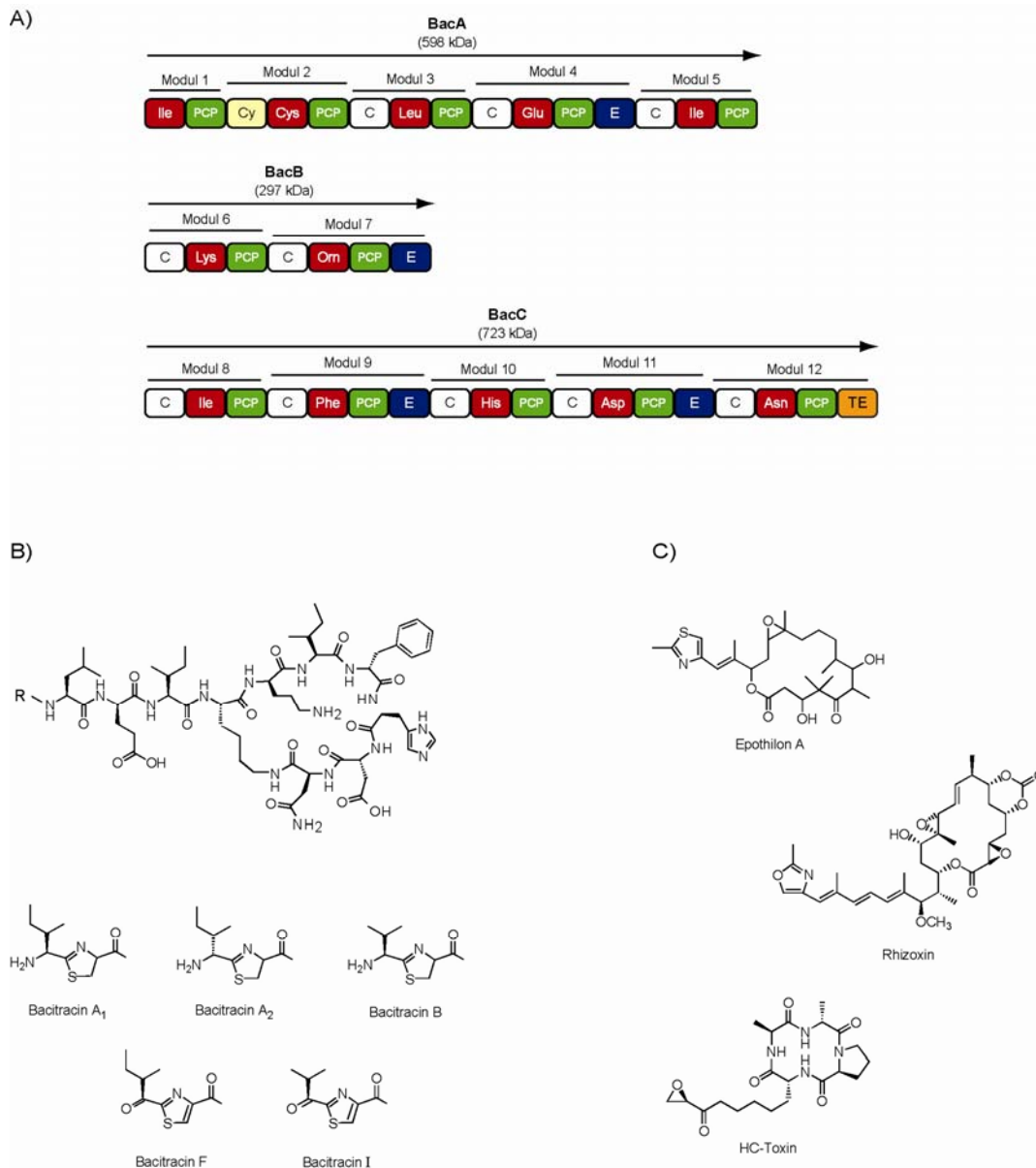
C) Der katalytische Mechanismus am Beispiel der Srf-TE: 1) Die Übertragung des Protons des katalytisch aktiven Ser<sub>80</sub> auf His<sub>207</sub> ermöglicht die Acylierung des PCP-gebundenen Peptidyl-Substrates. 2) Das negativ geladene Oxyanion des tetraedrischen Übergangszustandes wird durch zwei NH-Gruppen des Peptidrückgrates der Zyklaste stabilisiert. 3) Das intramolekulare Nukleophil des acylierten Peptides kann das Carbonyl-C-Atom des ausgebildeten Oxoesters angreifen. Hierbei fungiert das Histidin als Base. 4) Der Übergangszustand wird wiederum durch die Oxyanionbindungstasche stabilisiert und das zyklische Peptid von der Zyklaste freigegeben, wodurch der Ausgangszustand wiedererlangt wird.

## 2.3 Nichtribosomale Peptide

### 2.3.1 Das Peptidantibiotikum Bacitracin

Bacitracin ist ein metallabhängiges Dodecapeptid-Antibiotikum, das von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* produziert wird.<sup>[50]</sup> Es setzt sich aus einem Gemisch verschiedener verwandter Peptide zusammen (siehe Abb. 2.3.2A), von denen Bacitracin A das Hauptprodukt mit der höchsten antibiotischen Potenz darstellt.<sup>[70, 71]</sup> Bacitracin A besteht aus einer N-terminalen Pentapeptidkette und einem C-terminalen, aus sieben Aminosäuren bestehenden Laktam-Ring. Diese zyklische „Lasso“-Struktur, die einen terminalen Pharmakophor besitzt, ist auch in anderen biologisch-aktiven Naturstoffen (Epothilon, Rhizoxin, HC-Toxin) zu finden und verhindert durch ihren zyklischen Charakter den proteolytischen Abbau des Peptides (siehe Abb. 2.3.2B). Als strukturelle Besonderheit enthält Bacitracin vier D-konfigurierte Aminosäuren und die nichtproteinogene Aminosäure D-Ornithin<sub>7</sub>. Das auffälligste Merkmal ist allerdings der Thiazolin-Ring an Position 2 des Moleküls, der durch Kondensation der Carbonyl-Funktion des Ile<sub>1</sub> mit der Thiolseitenkette des L-Cysteins entsteht und in Bacitracin einen wichtigen Teil des molekularen Pharmakophors darstellt.<sup>[72, 73]</sup> Die verzweigt-kettige Laktam-Struktur des Bacitracins wird durch die Verbrückung der  $\epsilon$ -Aminofunktion des L-Lys<sub>6</sub> mit der Carboxyl-Funktion der C-terminalen Aminosäure L-Asn<sub>12</sub> erzielt.

Die antibiotische Wirkung des Bacitracin A beruht hauptsächlich auf der Inhibierung der Zellwandbiosynthese Gram-positiver Bakterien. Als Transporter für Murein, bzw. Peptidoglykan-Einheiten durch die Zellmembran dient in Gram-positiven Bakterien das membrangebundene C<sub>55</sub>-Isoprenylpyrophosphat (IPP).<sup>[74]</sup> Bacitracin kann bei Anwesenheit zweiwertiger Metallionen einen stabilen 1:1-Komplex bilden, der in der Lage ist, an den IPP-Transporter zu binden. Die Koordination des zweiwertigen Metalls im Metallobacitracin-Komplex wird dabei durch den  $\epsilon$ -Stickstoff des His<sub>10</sub>, der Carboxyl-Funktion des D-Glu<sub>4</sub> und des Thiazolin Stickstoff-Atoms ermöglicht. Hierbei entsteht außerdem eine charakteristische Faltung des Bacitracins, die einen hydrophoben Kontakt der Seitenketten des Ile<sub>5</sub> und D-Phe<sub>9</sub> mit den Undecaisoprenyl-Pyrophosphaten sicherstellt. Die Bindung des Metallobacitracins an den Transporter verhindert dessen notwendige Dephosphorylierung durch eine membranständige Pyrophosphatase, und führt zu einem Abbruch der Zellwandbiosynthese.<sup>[75, 76]</sup>



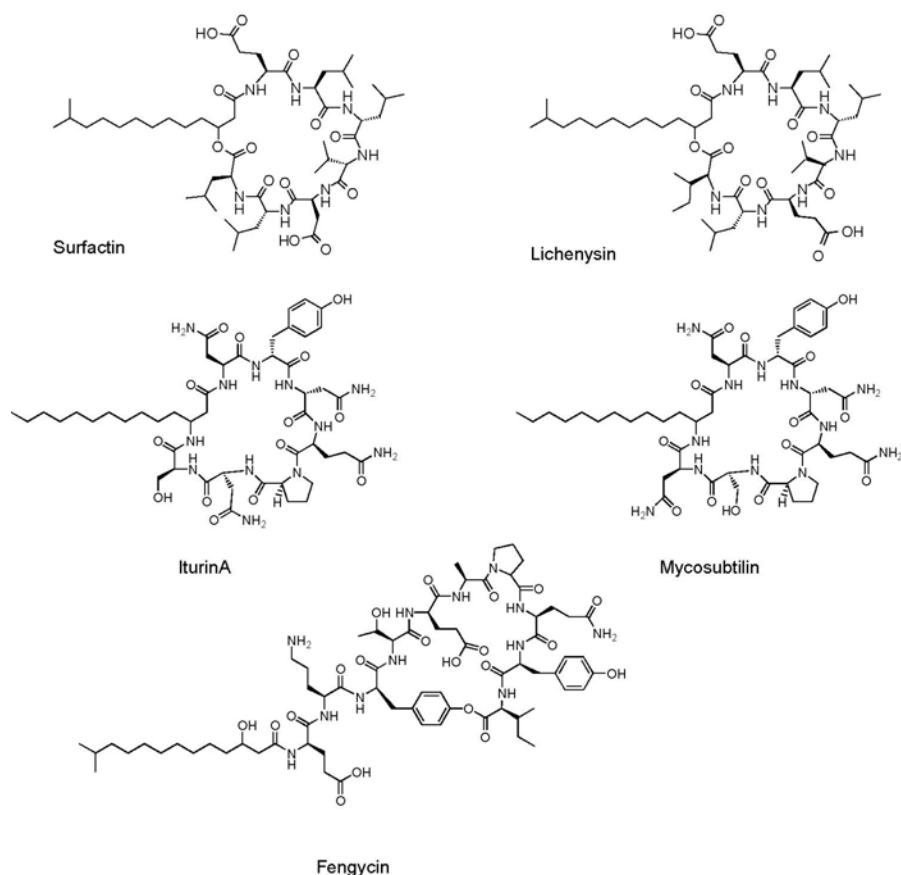
**Abb. 2.3.1: Das Peptidantibiotikum Bacitracin:** A) Die nichtribosomalen Peptidsynthetasen des Bacitracin A. Zwölf Module sorgen für den Aufbau des zyklischen Dodecapeptides. B) Darstellung der zyklischen Leitstruktur des Bacitracins. Durch die Veränderung der Aminosäure-Sequenz und des funktionellen Heterozyklus (unten) konnten in der Natur über 20 verschiedene Bacitracine isoliert werden. Der toxische Metabolit Bacitracin F entsteht durch Desaminierung des Bacitracin A und nachfolgende Oxidation des Heterozyklus. C) Zyklische Lasso-Strukturen anderer bioaktiver Naturstoffe. Allen gemein ist die Ring-Struktur, die den proteolytischen Abbau verhindert und das molekulare heterozyklische Pharmakophor am terminalen Ende des Moleküls dadurch schützt.

Zusätzliche bioaktive Eigenschaften des Bacitracins konnten auf die Proteinbiosynthese, auf Membranfunktionen und Proteasen beobachtet.<sup>[77-80]</sup> Das antibiotische Potential des Bacitracin A wird seit vielen Jahren genutzt, um Infektionen mit Gram-positiven Organismen zu behandeln.<sup>[81]</sup> Allerdings ist eine systemische Applikation von Bacitracin A kontraindiziert, da es im menschlichen Körper zur Bildung des nephrotoxischen Metabolit Bacitracin F kommt. Dieser wird durch selektive N-terminale Desaminierung des Bacitracin A und anschließender Resonanzstabilisierung durch Oxidation des Thiazolin-Ringes gebildet. Die dabei entstehende reaktive Ketofunktion des Bacitracin F kann mit verschiedenen Proteasen kovalente Bindungen ausbilden und zu deren Inaktivierung führen. Trotz der metabolischen Umwandlung wird Bacitracin bei gastrointestinalen Infektionen, die durch Antibiotika-Unverträglichkeiten hervorgerufen werden, verwendet, und ist für topische Applikation in verschiedenen Präparaten zugelassen.<sup>[50]</sup> Da bakterielle Resistenzen gegenüber Bacitracin bis heute kaum beobachtet wurden, kann es als ideale Leitstruktur für das Design neuer potenter Peptid-Antibiotika dienen (siehe Kapitel 5.1.5).

### 2.3.2 Die Lipopeptide des *Bacillus subtilis*

Viele Stämme von *Bacillus subtilis* sind dafür bekannt, dass sie nichtribosomale Sekundär-Metabolite produzieren, die vergleichbare Strukturen aufweisen (siehe Abb. 2.3.2B).<sup>[82]</sup> Diese amphiphilen Moleküle besitzen meist lipidierte Zykohepta- oder Zyklodecapeptidische Strukturen. Der Ringschluss wird über ein in  $\beta$ -Position der Fettsäure integriertes Nukleophil vollzogen und führt zur Ausbildung makrozyklischer Laktame, wie im Fall der Iturin-Familie,<sup>[83]</sup> oder makrozyklischer Laktone, wie im Surfactin und Lichenysin.<sup>[84, 85]</sup> Eine Ausnahme stellen die beiden verzweigtkettenigen Lipopeptide Fengycin und Plipastatin dar.<sup>[55, 86]</sup> Der prominenteste Vertreter der Lipopeptid-Familie, das Surfactin, ist eines der potentesten zyklischen Biotenside. Das Interesse an der Verwendung von Biotensiden hat in den letzten Jahren stetig zugenommen, da es sich bei diesen Molekülen um biologisch abbaubare Verbindungen mit niedriger Toxizität handelt, die in der Lage sind, hydrophobe Verbindungen zu solvatisieren.<sup>[87-89]</sup>

Surfactin besitzt zusätzlich zu seinen tensidischen Eigenschaften ebenfalls noch antibakterielle, antivirale und hämolytische Aktivität.<sup>[54]</sup> Die antibiotische Aktivität des Surfactins resultiert aus dem amphiphilen Charakter des Moleküls, der eine Porenbildung innerhalb von Membranen ermöglicht.<sup>[90]</sup>



**Abb. 2.3.2: Die nichtribosomal von *Bacillus subtilis* erzeugten Lipopeptide:** Bei den dargestellten Lipopeptiden handelt es sich bei Surfactin und Lichenysin um heptapeptidische Makrolaktone. In der Klasse der Iturine (Iturin A, Mycosubtilin) findet man die Ausbildung heptapeptidischer Laktamstrukturen. Nur das Dekalipopeptid Fengycin bildet eine verzweigt-kettige Struktur aus.

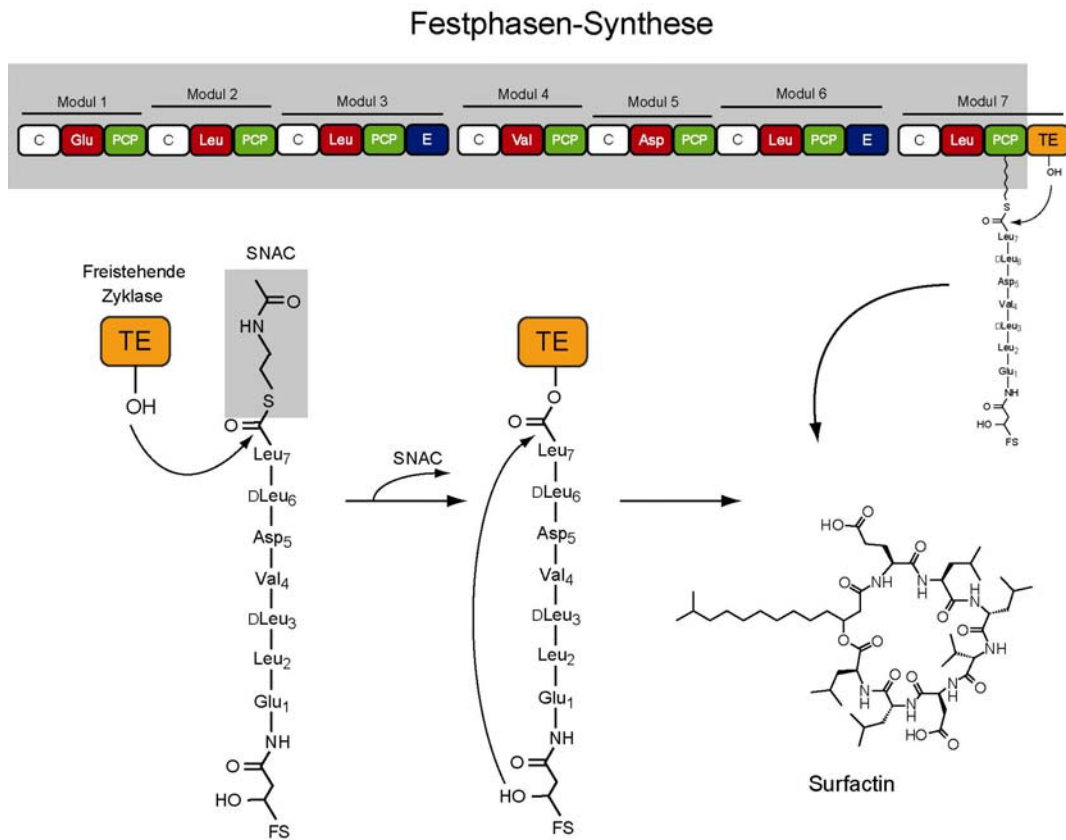
Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die rekombinante Surfactin-Zyklase durch Inkubation mit linearen Peptidyl-SNAC-Substraten zur *in vitro* Produktion zyklischer Surfactin-Analoga verwendet werden konnte.<sup>[54]</sup> Dieser chemoenzymatische Ansatz (siehe Kapitel 2.3.3) stellt zusammen mit der gelösten Kristallstruktur dieser Zykase<sup>[63]</sup> ein optimales Modellsystem zur Untersuchung nichtribosomaler Zyklisierungen dar (siehe Kapitel 5.2).



### 2.3.3 Die chemoenzymatische Peptidzyklisierung

Lange Zeit war es nicht möglich, einen Aufschluss über das Zyklisierungsverhalten der NRPS-Zyklasten zu erlangen und ihre Aktivität zu modulieren. Die Entdeckung *in-trans* katalysierender Zyklasten in Polyketidsynthasen bestätigte die Vermutung, dass es sich bei diesen Enzymen um autonom gefaltete Einheiten des Gesamtzymkomplexes handelt.<sup>[49]</sup> Es besteht ein hohes Interesse an enzymatisch vermittelten Zyklisierungsreaktionen, da etablierte chemische Zyklisierungsstrategien unter der schlechten Löslichkeit der Substrate oder mangelnder stereochemischer Kontrolle leiden.<sup>[91, 92]</sup> Enzymatische Reaktionen sind durch ihre hohe Effizienz bestens geeignet, unter milden physiologischen Bedingungen die Reaktion unter strenger Einhaltung der gewünschten Regio- und Stereoselektivität zu katalysieren. Erste Untersuchungen von NRPS-Zyklasten, die von ihrer C-terminalen Synthetase getrennt wurden, deckten deren katalytische *in vitro* Aktivität als rekombinant erzeugte freistehende Domänen auf.<sup>[22, 57]</sup> Hierbei konnten diese Zyklasten mit chemisch hergestellten Substratanaloga inkubiert werden und erlaubten die biochemische Charakterisierung der katalysierten Zyklisierungsreaktion. Die Substratanaloga wurden durch chemisch-automatisierte Festphasensynthese hergestellt, in der die wachsende Peptidkette an einem unlöslichen Polystyrol-Harz gebunden ist, und damit die natürliche Synthese des am Multienzymkomplex gebundenen Peptidylrestes imitiert (siehe Abb. 2.3.3).<sup>[93]</sup> Die durch dieses Verfahren hergestellten Substrate können anschließend C-terminal mit einer synthetischen Abgangsgruppe versehen werden, um die natürlich auftretende Situation, in der die Peptidkette als Thioester des Ppan-Arms gebunden vorliegt, nachzuahmen. Für diesen biomimetischen Ansatz erwies sich besonders die SNAC-Abgangsgruppe, die dem terminalen Teil des Ppan-Arms entspricht, als effektiver Imitator der physiologischen Situation und erlaubte eine biokombinatorische Herstellung zyklischer Peptidbibliotheken.<sup>[94, 95]</sup> Gleichbedeutend für die *in vitro* Aktivität vieler rekombinanter NRPS-Zyklasten stellte sich die Entdeckung der Thiophenol-Abgangsgruppe heraus. Durch das hohe Gruppen-Übertragungspotential dieser Abgangsgruppe bietet sie eine Alternative der C-terminalen Aktivierung synthetischer Peptidyl-Substrate und ermöglicht die effektive Acylierung verschiedener NRPS-Zyklasten, die gegenüber Peptidyl-SNAC-Substraten inaktiv waren.<sup>[96]</sup> Das chemoenzymatische Makrozyklisierungspotential verschiedenster

NRPS-Zyklen kann heute also genutzt werden, um kleine zyklische Moleküle und deren Derivate herzustellen, die ein enormes therapeutisches Potential besitzen.



**Abb. 2.3.3: Die chemoenzymatische Zyklisierung:** Die nichtribosomale Peptidsynthese, hier am Beispiel des Surfactins dargestellt, wird durch Peptid-Festphasensynthese ersetzt. Die C-terminale Zyklase kann als rekombinant produziertes freistehendes Enzym genutzt werden, um artifizielle Substratanaloga zu zyklisieren. Die Erkennung der Substratanaloga wird durch die C-terminale Aktivierung des Peptidyl-Substrates durch eine Abgangsgruppe gewährleistet, die den natürlichen terminalen Teil des Ppan-Kofaktors nachahmt.

## 2.4 Biotechnologische Manipulation enzymatischer Katalyse

Die Biokatalyse ermöglicht die milde und selektive Synthese von Produkten durch den Einsatz von Enzymen. Die Verwendung rekombinanter Enzyme in der heutigen Industrie, die so genannte weiße Biotechnologie, wird hauptsächlich zur Gewinnung von Vorstufen für die Synthese von Pharmazeutika, Pestiziden oder Feinchemikalien eingesetzt. Durch metagenomische Analyse können in unberührten Bodenproben bis zu  $10^4$  verschiedene Organismen-Arten identifiziert werden, die eine Vielzahl von potentiellen neuen Enzymen enthalten.<sup>[97]</sup> Um die industrielle Nutzung dieser Biokatalysatoren zu gewährleisten, müssen diese einfach isolierbar sein, homogen zu reinigen, eine hohe Aktivität und Stabilität aufweisen und die gewünschte Substratspezifität besitzen. Besonders die Enzymfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen hat durch ihre einfache Handhabung und die günstige Produktion einen breiten Einsatz in der weißen Biotechnologie gefunden.<sup>[98]</sup> Durch Techniken wie *in vitro* Evolution oder die Enzymaktivierung in nichtwässrigen Lösungsmitteln können natürliche Enzyme gezielt manipuliert werden, um gewünschte Substratspezifität zu erhalten oder höhere Produktausbeuten zu erzielen.<sup>[99, 100]</sup> Diese Techniken haben einen entscheidenden Beitrag daran, dass die Biokatalyse heute einen immer größeren Anteil an Produktionsabläufen in der pharmazeutischen Biotechnologie einnimmt.

### 2.4.1 Die Evolution der Enzyme

Die bekannten natürlich vorkommenden Enzyme können ihre Tertiärstruktur nur aus einer begrenzten Anzahl von ungefähr 1000 verschiedenen stabilen Faltungseinheiten ausbilden.<sup>[101, 102]</sup> Dieses biophysikalische Phänomen erklärt zwar die begrenzte Anzahl der bis heute identifizierten Proteinfaltungen, steht aber im Gegensatz zu der Anzahl an enzymatisch gebildeten Produkten, die in der Natur gefunden werden. Trotz der hohen *proof-reading* Aktivität der Polymerasen kommt es bei der Replikation zu einer geringen Anzahl von Mutationen, die zu einem Einbau „falscher“ Aminosäuren innerhalb des vorhandenen Enzyms führen. Durch diesen evolutionären Prozess entstehen Enzyme, die in der Lage sind, neue Reaktionen katalysieren zu können und dadurch eine Adaptierung des Organismus an veränderte Umweltbedingungen sicherstellen. Diese permanente natürliche Enzym-Evolution wird heute in vielen biochemischen Laboratorien nachgeahmt, um

vorhandene Enzyme mit neuen oder verbesserten Eigenschaften zu erzeugen. In Übereinstimmung mit der von Fischer postulierten „Schlüssel-Schloss“-Hypothese<sup>[103]</sup> oder deren modifizierten „Induced-fit“-Theorie von Koshland<sup>[104]</sup> kann angenommen werden, dass Enzyme in der Lage sind verschiedene Substrate, die sich nicht stark vom natürlichen Substrat unterscheiden, zu binden (Substrat-Promiskuität).<sup>[105]</sup> Die katalytische Umsetzung dieser Substrat-Analoga erfolgt allerdings nur stark verlangsamt oder gar nicht. Durch Proteinengineering wird deshalb häufig versucht, eine neue Tasche in ein Enzym einzuführen, um die Substrat-Analoga besser zu positionieren und eine Umsetzung dieser zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang haben sich besonders *in vitro* Evolutionstechniken herausgestellt, bei denen das gesamte Enzym einer ungerichteten Mutagenese unterworfen wird und anschließend die erzielten Mutanten auf eine gewünschte Reaktionkatalyse selektiert werden.<sup>[99]</sup> Bei vielen dieser *in vitro* Evolutionsansätze ist zu beobachten, dass einzelne Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf Substrat-Spezifität des Enzyms haben können.<sup>[106]</sup> Durch gezielte Mutationen von Aminosäuren, die direkt an der Substratbindung beteiligt sind und dementsprechend einen größeren Einfluss auf den katalytischen Mechanismus besitzen, konnte eine vollständige Aufhebung der katalytischen Eigenschaften oder eine Änderung der Substratspezifität beobachtet werden.<sup>[69, 107]</sup>

#### **2.4.2 Die Biokatalyse in nichtwässrigem Milieu (*Solvent Engineering*)**

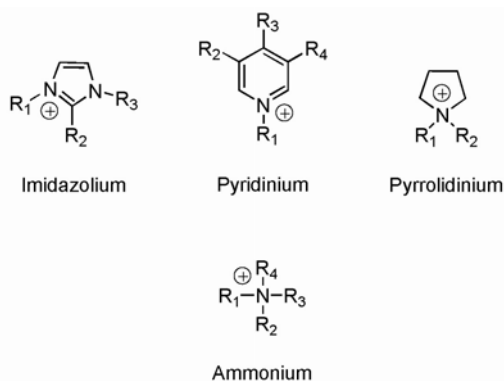
Früher wurde angenommen, dass Enzyme nur in wässrigem Milieu in der Lage sind, ihre natürlichen Reaktionen zu katalysieren. Seit dieser Mythos durch Klibanow *et al.* 1988 widerlegt wurde, ist das Interesse an enzymatischen Reaktionen in nichtwässrigem Milieu erstaunlich hoch.<sup>[108]</sup> Viele enzymatische Prozesse zeichnen sich durch eine limitierte Wasserlöslichkeit der Substrate, hydrolytische Nebenproduktbildungen oder Zersetzungen der Produkte in Wasser aus. Auch thermodynamische Probleme und verringerte enzymatische Stabilitäten können eine effiziente Biokatalyse verhindern.<sup>[109]</sup> Viele dieser Probleme können durch eine enzymatische Katalyse in organischen Lösungsmitteln überwunden werden.<sup>[109]</sup> Dabei werden sowohl in Mischungen eines organischen Lösungsmittel mit Wasser, wie auch in purem organischen Lösungsmitteln enzymatische Umsetzungen beobachtet.<sup>[110]</sup> Auch in anderen nichtwässrigen Medien kann eine

enzymatische Aktivität beobachtet werden, so sind enzymatische Prozesse auch in superkritischen Gasen, tiefsiedenden Hydrofluorocarbonaten, fluorierten Polyestern und ionischen Flüssigkeiten beschrieben worden.<sup>[111-113]</sup>

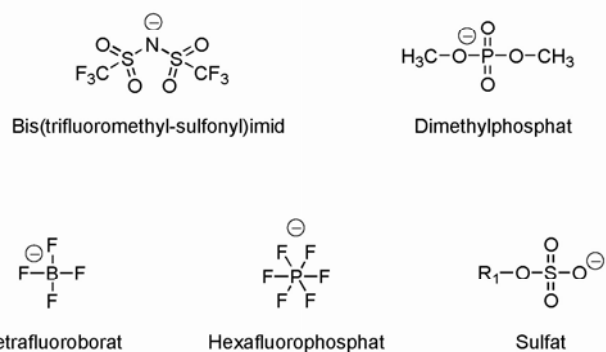
#### **2.4.2.1. Die enzymatische Katalyse in ionischen Flüssigkeiten**

Der Gedanke der Nachhaltigkeit gewinnt in der heutigen Chemie zunehmend an Bedeutung. Der Einsatz von Enzymen in organischen Lösungsmitteln erweitert zwar den biotechnologischen Einsatz dieser Biokatalysatoren und kann die Ausbeute der katalysierten Reaktion erhöhen, allerdings stellen Toxizität, Flüchtigkeit und Brennbarkeit einen nicht zu unterschätzenden Nachteil für die industrielle Produktion dar. Als viel versprechende „grüne“ Alternative zu konventionellen organischen Lösungsmitteln erweist sich die Biokatalyse in einer neuartigen Klasse von Lösungsmitteln, den ionischen Flüssigkeiten (IL).<sup>[114, 115]</sup> Unter ionischen Flüssigkeiten versteht man niedrigschmelzende, stabile Salze ( $T_m < 100^\circ\text{C}$ ), die bei Raumtemperatur flüssig und niederviskos sind. Sie werden häufig in der Literatur als „Designer-Lösungsmittel“ bezeichnet, da sich durch die Wahl unterschiedlicher Ionenzusammensetzungen die chemisch-physikalischen Eigenschaften des ILs variieren lassen. Als wichtigste Kationentypen haben sich alkylierte Imidazolium-, Pyrrolidinium- und Pyridinium-Ionen herausgestellt, die durch ihre asymmetrischen Eigenschaften starken Einfluss auf die Stabilität des Salzes haben. Je nach Alkylierungsreagenz können in der Synthese des Salzes unterschiedlichste organische und anorganische Anionen verwendet werden (siehe Abb. 2.4.1). Beispielsweise kann eine Vergrößerung des Anions bei gleicher Ladungsverteilung eine Schmelzpunktniedrigung zur Folge haben und zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit beitragen. Im Jahre 2000 wurde die erste biokatalysatorische Reaktion in einer ionischen Flüssigkeit durchgeführt, in der eine erhöhte Stabilität von Thermolysin in 1-Butyl-3-Methylimidazolium-hexafluorophosphat (BMI-PF<sub>6</sub>) bei der enzymatischen Reaktion von Z-Aspartam beobachtet werden konnte.<sup>[116]</sup> Die Substitution des wässrigen Puffermilieus einer enzymkatalysierten Synthese durch eine ionische Flüssigkeit kann außer einer Erhöhung der Enzymstabilität auch die hydrolytische Nebenproduktbildung verhindern, und erweist sich somit als interessante *Solvent-Engineering*-Strategie für die Zyklisierungsreaktion der NRPS-Zyklus (siehe Kapitel 5.2.3.).

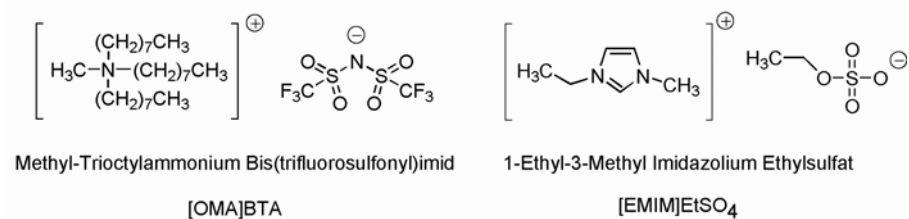
Kation:



Anion:



Beispiele:



**Abb. 2.4.1: Ionische Flüssigkeiten:** Dargestellt sind typische Kationen und Anionen ionischer Flüssigkeiten. Diese sind wahlweise miteinander kombinierbar und ermöglichen eine exakte Einstellung der gewünschten physikalisch-chemischen Eigenschaften des ILs. Beispiele für in dieser Arbeit verwendete ILs sind [OMA]BTA und [EMIM]EtSO<sub>4</sub>. R=Alkyl.

## 2.5 Aufgabenstellung

Die zyklischen Strukturen nichtribosomaler Peptide stellen ein wichtiges Merkmal für die Bioaktivität dieser Naturstoffklasse dar. Die wichtigsten zyklischen Strukturen stellen der Einbau heterozyklischer Ringe und die Makrozyklisierung des Peptides dar. Ziel dieser Dissertation war es, die Bedeutung dieser Zyklisierungen für eine chemoenzymatische Synthese herauszustellen.

Zum einen sollten verschiedene fünfgliedrige Heteroaromaten an Position 2 der Peptidsequenz des Bacitracins eingebaut werden und so den natürlich vorkommenden Thiazolin-Ring ersetzen. Durch die erhaltenen synthetischen Substrat-Derivate sollte der Einfluss unterschiedlicher Heterozyklen auf die Zyklisierungsreaktion der Bacitracin-Zyklase herausgefunden werden. Die durch diese chemoenzymatische Zyklisierung erzeugten Bacitracin-Derivate sollten anschließend auf ihr antibiotisches Potential gegen einen Gram-positiven Indikatorstamm getestet werden.

Des Weiteren sollte das in der Zyklisierungsreaktion der Surfactin-Zyklase vorliegende wässrige Puffer-Milieu durch organische Lösungsmittel oder ionische Flüssigkeiten substituiert werden. Hierdurch sollte herausgefunden werden, ob die Surfactin-Zyklase in der Lage ist, in diesen Lösungsmitteln eine Zyklisierungsreaktion zu katalysieren und ob durch diesen Ansatz die hydrolytische Nebenproduktbildung verhindert werden kann.

Schließlich sollte herausgefunden werden, ob es möglich ist, durch gezielte Mutationen in der Primärsequenz der Surfactin-Zyklase eine Substrat-Toleranz gegenüber einer  $\beta$ -Aminofunktion als intramolekulares Nukleophil für die Zyklisierungsreaktion zu generieren.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

**Tabelle 3.1 Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autoklav	<i>Tuttnauer 5075 ELV</i>
Analysenwaagen	<i>Sartorius</i>
Brutschrank	<i>Köttermann 2736</i>
Clean-Bench	<i>Antair BSK</i>
DNA-Agarosegel-Dokumentation	<i>Cybertech CS1 Videokamera</i> <i>Mitsubishi Video Copy Processor Thermodrucker</i>
Elektroporationspulser	<i>Biorad Gene PulserII</i>
ESI-MS-System	<i>Hewlett Packard Series 1100</i>
FPLC-Säulen	<i>Amersham Biosciences HighTrap Desalting;</i> <i>Amersham Biosciences HiLoad Superdex Gelfiltrationssäule</i>
FPLC-System	<i>Amersham FPLC-System 250:</i> <i>Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500</i> <i>Uvicord Optische Einheit UV-1, Uvicord Kontroll Einheit UV-1</i> <i>2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102</i> <i>Injektions-Ventil V-7, 3-Wege-Magnetventil PSV-100</i> <i>Fraktion Sammler FRAC-100</i>
Gefriertrocknungs-Anlagen	<i>Edwards Freeze Dryer Super Modulyo</i> <i>Christ Alpha 2-4 LSC</i>
HPLC-Säulen	<i>Macherey &amp; Nagel</i> <i>Nucleodur 250/3 C<sub>18</sub>ec, Nucleodur C<sub>18</sub>ec 125/2; RP-C<sub>8</sub> Nucleosil 120-3, Agilent Zorbax Rx-C8</i>
HPLC-System	<i>Agilent series 1100 HPLC-System</i> <i>Vakuum-Entgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Autosampler, HP-Chemstation</i>
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific Series25 Incubator Shaker;</i> <i>New Brunswick Scientific Innova4300 Incubator Shaker</i>
NMR	<i>Bruker Advance AC-300</i>
MALDI-TOF	<i>Bruker FLEXIII</i>
MS-MS-Sequenzierung	<i>Applied Biosystems API Qstar PulsarI</i>



Peptid-Synthetisierer	<i>Advanced ChemTech</i> APEX396 Synthesizer
PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
Photometer	<i>Amersham Biosciences</i> Ultrospec3100Pro <i>PegLab</i> NanoDrop Spectrophotometer ND1000
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro90CN
Schüttelinkubator	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Comfort
Speed-Vac	<i>Uniequip</i> Univapo 150H
Thermocycler	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
Vakuumgeltrockner	<i>Fisherbrand</i> FSGD-5040
Vortexer	<i>Scientific Industries</i> Vortex Genie2
Wasserbad	<i>Infors</i> Aquatron Rundsüttelmaschine
Zellaufschluss	<i>SLM Aminco</i> French Pressure Cell Press 5.1
Zentrifugen	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5415D; <i>Heraeus</i> Biofuge Pico; <i>Sorvall</i> RC26Plus, RC5BPlus

### 3.2 Chemikalien, Enzyme, Laborprodukte

In Tabelle 3.2 nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen *Fluka* und *Sigma-Aldrich* in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung den Synthesen zugeführt.

**Tabelle 3.2 Verwendete Chemikalien, Enzyme und Laborprodukte**

<b>Hersteller</b>	<b>Produkt(e)</b>
<i>Agilent Technologies</i>	DHB-Matrix, C <sub>8</sub> -Zorbax HPLC-Säule
<i>Amersham Biosciences</i>	Ampicillin, Kanamycin, Tetrazyclin, Hefeextrakt, IPTG, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1, verschiedene Restriktions-Endonukleasen
<i>Bachem</i>	N <sub>α</sub> -Fmoc-geschützte Aminosäuren, N <sub>α</sub> -Boc-geschützte Aminosäuren
<i>Eurogentech</i>	Agarose, Elektroporationsküvetten
<i>Fluka</i>	Verschiedene trockene Lösungsmittel, SDS, TEMED

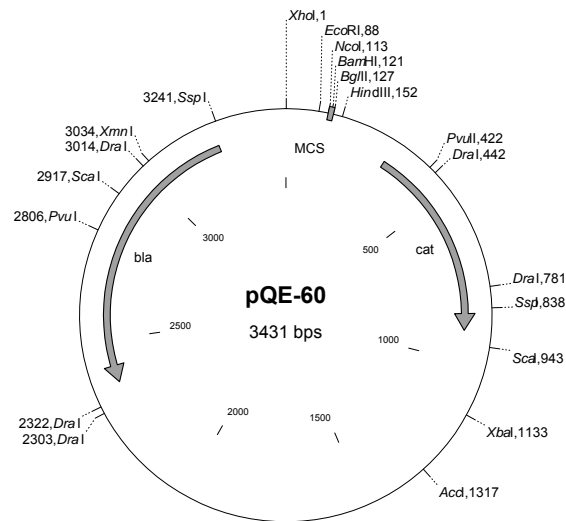
<i>Macherey und Nagel</i>	C <sub>18</sub> -Nucleodur HPLC Säulen, RP-C <sub>8</sub> Nucleosil HPLC Säule
<i>Merck</i>	Glaskaschierte 0.25 mm Silikagel-Platten 60F-254
<i>Millipore</i>	Amicon Ultra (0,025 µm)
<i>New England Biolabs</i>	Desoxyribonucleotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), verschiedene Restriktions-Endonukleasen, Protein-Marker, 1kb-DNA-Marker
<i>Novabiochem</i>	N <sub>α</sub> -Fmoc-geschützte Aminosäuren, 2-Chlorotriylchlorid Harz, HBTU, HOBT, PyBOP
<i>Nunc</i>	Sterile 96-Well Mikrotiter-Platten (Nunclon-Surface)
<i>Oxoid</i>	Agar Nr.1, Trypton
<i>Qiagen</i>	Oligonukleotide, QIAquick-spin PCR Purification Kit, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose
<i>Roth</i>	Ethidiumbromid, β-Mercaptoethanol, Acrylamid für SDS-PAGE, Piperidin
<i>Schleicher &amp; Schüll</i>	Sterilfilter (0,45 µm)
<i>Solvent Innovation</i>	Ionische Flüssigkeiten
<i>Sigma</i>	EDTA, N-Acetylcysteamin, Thiophenol, trockenes DMF
<i>Stratagene</i>	QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, PfuTurbo DNA Polymerase
<i>TCI Europe</i>	(R)-3-Hydroxymyristinsäure
<i>Vivascience AG</i>	Vivaspin 20 Konzentratoren

### 3.3 Vektoren

#### 3.3.1 pQE60

Für die Expression des *bac-pcp-te* Genes in *E. coli* wurde der pQE60-Vektor (3431bp) (*Qiagen*) verwendet. Er besitzt einen *E. coli* T5-Phagen-Promotor, zwei *lac*-Operator-Erkennungssequenzen, sowie eine *E. coli* optimierte synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII und den Replikationsursprung ColE1. Die *multiple-cloning-site* (MCS) wird durch die Restriktionsschnittstellen *Nco*I, *Bam*HI, und *Bgl*II gebildet. Stromabwärts befindet sich die Sequenz für den His<sub>6</sub>-Tag und direkt anschliessend Stopcodons in den drei Leserahmen. Die Expression des Gens, das in

die MCS kloniert wurde, führt zur Produktion des Proteins mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Durch Expression des  $\beta$ -Laktamasegens *bla* vermittelt der pQE60-Vektor eine Resistenz gegen Ampicillin.



**Abb. 3.3.1: Der pQE60-Vektor**

### 3.3.2 pREP4

Das pREP4-Plasmid (3740bp) (Qiagen) wird als Helferplasmid bei der Expression eingesetzt. Neben dem *neo*-Gen, das Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, trägt es das *lacI*-Gen, welches für den Lac-Repressor codiert.<sup>[117]</sup> Durch die Lac-Repressor-Produktion kann das pREP4-Plasmid zur Regulation der Expression von Genen in pQE-Derivaten genutzt werden. Der Replikationsursprung P15A ist kompatibel zum ColE1, sodass das pREP4-Plasmid zusammen mit den pQE-Vektoren repliziert werden kann.

### 3.4 Mikroorganismen

#### 3.4.1 *E. coli* XL1-Blue

Der *Escherichia Coli* XL1-Blue wurde häufig für Klonierungsarbeiten benutzt. Er besitzt den Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lac<sup>q</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)].

#### 3.4.2 *E. coli* Top 10

Bei diesem *E. coli* Stamm handelt es sich ebenfalls um einen Klonierungsstamm. Er besitzt den Genotyp F- *mcrA*. (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*.M15.*lacX74 deoR recA1 araD139. (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*.

#### 3.4.3 *E. coli* BL21(ΔDE3)

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem Genotyp F<sup>-</sup>, *dcm*, *hsdS* r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>, *ompT*, *gal* wird häufig für als bakterieller Wirt für die Expression rekombinanten Gene verwendet. Diesem Stamm fehlen die Proteasen *lon* und *OmpT* wodurch eine signifikante Erhöhung der Protein-Stabilität erreicht wird. Zusammen mit *lacZ* und dem Promotor *lacV5* ist das Gen der T7-Polymerase auf dem Prophagen im Chromosom integriert.

#### 3.4.4 *E. coli* M15

Ebenfalls für Expressionen wurde der *E. coli* M15-Stamm mit dem Genotyp *naI<sup>s</sup>, str<sup>s</sup>, rif<sup>s</sup>, lac, ara, gal, mtl*, F<sup>-</sup> verwendet. Diesem Stamm fehlt die T7-Polymerase.

#### 3.4.5 *B. subtilis* PY 79

Der *Bacillus subtilis* Stamm PY 79 wurde ausschließlich für biologische Aktivitätsbestimmungen verwendet. Der Genotyp ist *sfp*<sup>0</sup>.

### 3.5 Medium

Für die Anzucht der verwendeten Mikroorganismen wurden ausschließlich LB-Medium verwendet.<sup>[118]</sup> Festmedium wurde durch Zusatz von 1,2% Agar (w/v) Nr.1 vor dem Autoklavieren (121°C; 1,5 bar; 30 min) hergestellt.

LB-Medium	Bactotrypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L

Dem Medium wurde nach Bedarf Antibiotika in den Standardkonzentrationen 100 µg/mL Ampicillin und 25 µg/mL Kanamycin zugesetzt.

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Methoden handelt es sich um etablierte und veröffentlichte Standardtechniken.<sup>[118]</sup> Daher wird in diesem Zusammenhang nur auf die Plasmidkonstruktion und auf abweichende Techniken eingegangen.

#### 4.1.1 Konstruktion von pQE60[bac-pcp-te]

Das für die Klonierung erforderliche Genfragment *bac-pcp-te* wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus der chromosomalen DNA des Bacitracin produzierenden Stammes *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 unter Verwendung der Pfu Turbo DANN Polymerase (*Stratogene*) und den folgenden synthetischen Oligonukleotiden (*Operon/Qiagen*) nach Angaben des Herstellers amplifiziert. Die eingeführten Schnittstellen wurden unterstrichen:

5'-GCG CTC CAT GGA ATA CGA GCC TC -3'  
und 5' GGA TGC CGT TTG GAT CCT ATT TTG A-3'

Die Reinigung des PCP-Ansatzes erfolgte mit dem „QIAquick-spin PCR Purification Kit“ (*Qiagen*) nach Angaben des Herstellers. Das gereinigte PCP-Produkt wurde anschließend mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NcoI/BamHI* geschnitten und in einen analog geschnittenen pQE60-Vektor ligiert. Die Identität dieses Plasmides pQE60/bac-pcp-te konnte durch DNA-Sequenzanalyse (*GATC Biotech*) nachgewiesen werden. Zu Präparationszwecken wurden *Escherichia coli* TOP10 Zellen mit dem vorliegenden Plasmid transformiert.

#### 4.1.2 Konstruktion der Plasmide für die Srf-TE Mutationsanalysen

Alle Plasmide, die für die Mutationsanalysen (*Rational-Design*) der Surfactin TE hergestellt wurden, basieren auf dem Plasmid pQE60[srf-te].<sup>[59]</sup> Die Einführung der Mutationen erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (*Stratogene*) nach den Angaben des Herstellers. Nachfolgend sind die aus der Mutagenese resultierenden Plasmide und die jeweils

verwendeten Oligonukleotide aufgeführt, wobei die eingeführten Mutationen hervorgehoben wurden:

S80A: 5' CAT TGT TTG GAT ATG CAG CGG GAT GCA GCC 3'  
 und 5' GGC TGC ATC CCG CTG CAT ATC CAA ACA ATG 3'  
 Y159H: 5' GCC TTT TAC TCA TAC CAC GTC AAC CTG ATC AGC 3'  
 und 5' GCT GAT CAG GTT GAC GTG GTA TGA GTA AAA GGC 3'  
 A81S: 5' CAT TGT TTG GAT ATT CAI CCG GAT GCA GCC TGG CG 3'  
 und 5' CGC CAG GCT GCA TCC GGA TGA ATA TCC AAA CAA TG 3'  
 V27I: 5' CGC ATT TCC GCC GAT TCT GGG CTA TGG CC 3'  
 und 5' GGC CAT AGC CCA GAA ICG GCG GAA ATG CG 3'

Die Doppelmutante A81S/V27T basiert auf dem mutierten Plasmid pQE60[srf-teA<sub>81</sub>S] und wurde analog der beschriebenen ortsgerichteten Mutagenese mit Hilfe der Oligonukleotide für V27T hergestellt.

## 4.2 Proteinchemische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken der Proteinanalytik (SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der SDS-Gele) wurden nach Laemmli<sup>[119]</sup> und Bennett<sup>[120]</sup> durchgeführt.

### 4.2.1 Genexpression

Die heterologe Expression der TE- und PCP-TE-Konstrukte erfolgte in den Expressionsstämmen *E.coli* M15 (pREP4) oder *E.coli* BL21 (DE3). Diese Expressionsstämme wurden mit dem jeweiligen sequenzierten Expressionsplasmid transformiert. 3 mL einer Übernachtskultur des entsprechenden Expressionsstammes wurden in 300 mL LB-Medium (Amp<sup>100</sup>, Kan<sup>25</sup>) inokuliert und bei 30-37°C, 250 rpm bis zu einer OD=0.6 (600 nm) in einem Luftschüttler inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0.5 mM IPTG gestartet und die Kultur für weitere 2 h bei 30°C inkubiert, bevor sie durch Zentrifugation (5000 rpm, 4°C, 20 min) geerntet wurde. Die Zellpellets wurden in Hepes-A-Puffer (50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 8.0)

resuspendiert und entweder bei -20°C gelagert oder direkt der Proteinreinigung zugeführt.

#### 4.2.2 Zellaufschluss

Die in 10 mL Hepes-A-Puffer resuspendierten Zellen wurden unter Kühlung (4°C) durch zweimaliges Durchlaufen einer „French Press Zelle“ (*SLM Aminco*) aufgeschlossen. Die Zelltrümer und unlöslichen Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt (17000 rpm, 4°C, 30 min) abgetrennt und der klare Überstand des Zentrifugates für die Affinitätschromatographie verwendet.

#### 4.2.3 Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie

Die effiziente Reinigung der rekombinanten, mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehenen, Enzyme konnte unter Verwendung einer Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (*Qiagen*) an einer FPLC-Anlage (*Amersham Biosciences*) bei 4°C erreicht werden. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min in 4% Hepes-B-Puffer (50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0) mit dem Überstand der Zellaufschluss-Zentrifugation beladen. Der Waschvorgang sowie die nachfolgende Elution wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm in einer Durchflusszelle verfolgt. Nachdem die Absorption die Basislinie wieder erreichte, erfolgte die Elution des Enzymes durch Anlegen eines 30 minütigen Gradienten von Hepes-A-Puffer zum imidazolhaltigen Hepes-B-Puffer bei einer Flussrate von 0.8 mL/min. Innerhalb der gesammelten 2 mL Fraktionen wurde durch Bradford-Test<sup>[121]</sup> und SDS-PAGE-Analyse diejenigen Fraktionen identifiziert, die das gewünschte rekombinante Enzyme enthielten. Diese wurden vereint und gegen Assay-Puffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) unter Verwendung von „HiTrap™ Desalting“ Säulen (*Amersham Biosciences*) dialysiert und anschliessend mit Hilfe von Amicon-Ultrafiltrationzellen (*Millipore*) ankonzentriert. Die Konzentration der gereinigten Enzyme wurde photometrisch (280 nm) unter Berücksichtigung des berechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt (Tabelle 4.1). Die theoretischen Extinktionskoeffizienten wurden unter Verwendung des Programmes Protean (DNASar) berechnet.



**Tabelle 4.1: Theoretischer Extinktionskoeffizient (280 nm)**

<b>Protein</b>	<b>Theoretischer Extinktionskoeffizient [mg/mL]</b>
SrfTE (pQE60)	0.87
SrfTE Mutanten (pQE60)	0.87
Bac-PCP-TE (pQE60)	1.13

#### 4.2.4 Gelfiltration

Um die Homogenität des gereinigten Enzymes zu gewährleisten, wurde das Enzym Bac-PCP-TE einer zusätzlichen Gel-Filtration unterzogen. Die auf 2 mg/mL ankonzentrierte Enzym-Lösung wurde unter Verwendung einer Äkta FPLC-Anlage (*Amersham Biosciences*) auf eine mit Hepes-A-Puffer äquilibrierte HiLoad Superdex<sup>TM</sup> 26/60 (*Amersham*) Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit einer Flussrate von 2 mL/min eluiert.

#### 4.2.5 Lyophilisation

Unter Lyophilisation versteht man das Verfahren, das gefrorenem wasserhaltigem Material bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts, das Wasser durch Sublimation entzieht. Die schonende Entfernung des Lösungsmittels (H<sub>2</sub>O) der gereinigten Enzyme für Assays in alternativen Lösungsmitteln wurde durch eine Lyophilisation über 10 h in einer Gefriertrocknungs-Anlage (*Edwards*) gewährleistet. Aliquots (50 µL, 100 µL) des frisch gereinigten Enzyms in Assay-Puffer (Srf-TE pH 6) wurde hierzu in flüssigem Stickstoff gefroren und das Wassers der gefrorenen Lösung unter Vakuum (5-10 mTorr, -50°C Kondensationstemperatur) entfernt.

## 4.3 Chemische Methoden

### 4.3.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Alle Reaktionen mit feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Argonatmosphäre und Verwendung von trockenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel (*Fluka*) wurden in höchster Reinheit eingesetzt. Tetrahydrofuran (THF) wurde über Kalziumhydroxid vorgetrocknet und anschliessend unter Rückfluss mit Natrium/Benzophenon destilliert. Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) wurde unter Rückfluss zusammen mit Kalziumhydrid destilliert. Alle anderen kommerziell erhältlichen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

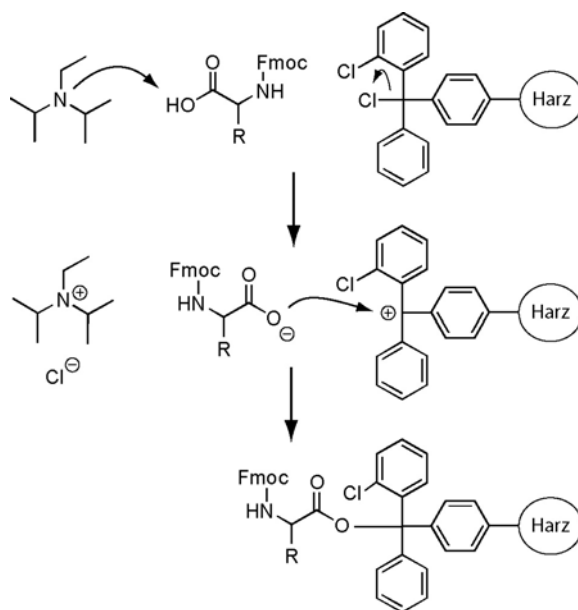
### 4.3.2 Festphasen-Peptid-Synthese (SPPS)

Die durch Merrifield entwickelte Festphasensynthese von Peptiden ist eine einfache und schnelle Möglichkeit Peptide in hohen Ausbeuten herzustellen.<sup>[122, 123]</sup> Die in dieser Arbeit hergestellten Peptide wurden ausschließlich durch Fmoc-basierte Festphasensynthese im *batch*-Verfahren an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer (Apex 396 Synthesizer, *Advanced ChemTech*) hergestellt. Als Festphase diente ein quervernetztes Polystyren-Harz, das kovalent an einen 2-Chlorotritylchlorid-Linker gebunden ist und die Abspaltung des orthogonal geschützten Peptides unter sehr milden sauren Bedingungen erlaubt. Die Maskierung der Aminosäureseitenfunktionalitäten wurde durch säurelabile Schutzgruppen sichergestellt [Tert-Butyl (tBu), Trityl (Trt) und Tert-Butyloxycarbonyl (Boc)].

#### 4.3.2.1 Die Initiation der Peptidsynthese

Der erste Schritt der Fmoc-basierten Peptidsynthese besteht in der Beladung des 2-Chlorotritylchlorid-Linkers des Harzes mit der C-terminalen Aminosäure des aufzubauenden Peptides. Dieser wichtige Schritt bestimmt in seiner Quantität die Produktausbeute. Um die effiziente Beladung des Harz zu sichern wurde dieses 30 min in trockenem DCM gequollen und anschließend mit 3 Äquivalenten der gewünschten N-Fmoc-geschützten Aminosäure und 8 Äquivalenten N,N-Diisopropyl-

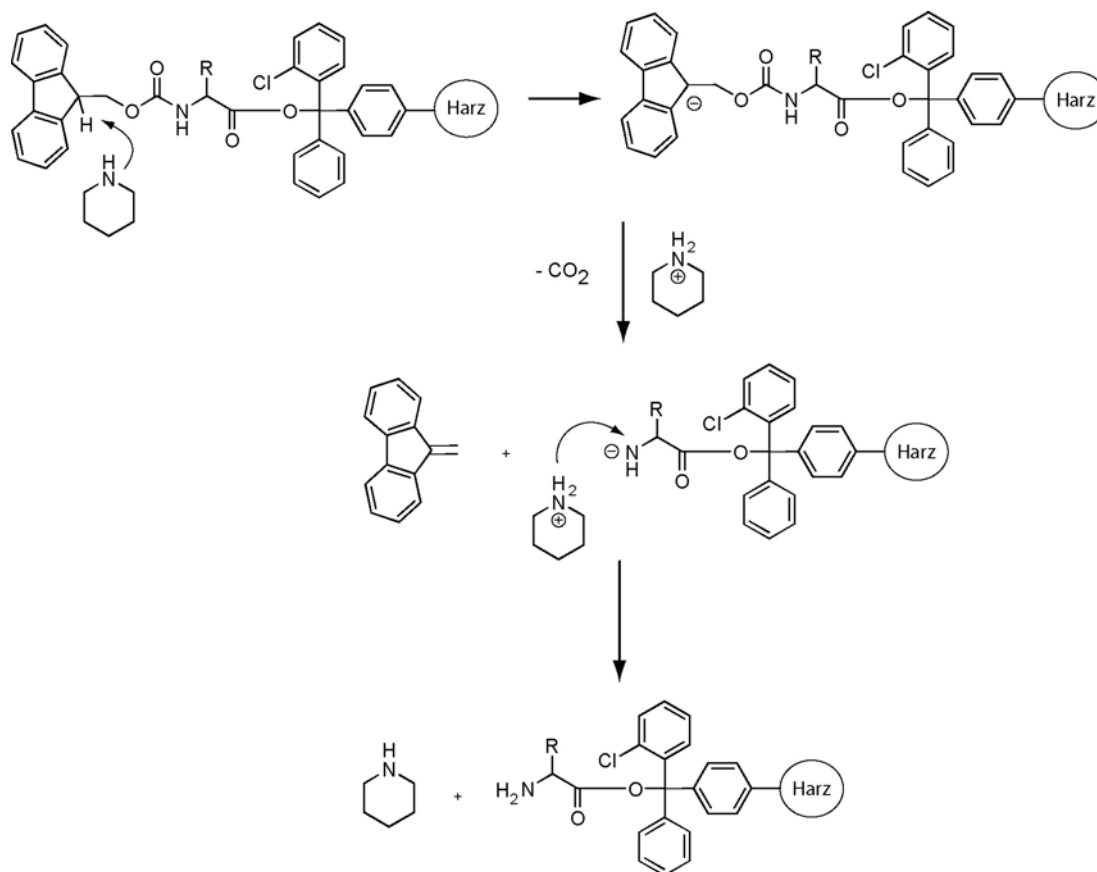
ethylamin (DIPEA) umgesetzt. Diese schwache Base ermöglicht die vollständige Deprotonierung der Carboxysäurefunktion der eingesetzten Aminosäure. Die deprotonierte Carboxyl-Gruppe kann nun nukleophil die Kohlenstoff-Chlor-Bindung des 2-Chlorotritylchlorides angreifen. Dadurch wird die erste Aminosäure unter Austritt eines Chlorid-Ions am Harz verankert (siehe Abb. 4.1) Der Ansatz wurde 2 h gerührt, und anschließend das Lösungsmittel abfiltriert, das Harz mehrere Male mit DCM gewaschen und die unreaktierten Stellen des Harzes durch Methanol abgedeckt, um den Aufbau von verkürzten Peptidfragmenten zu verhindern.



**Abb. 4.1:** Die Beladung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes mit der ersten Aminosäure.

#### 4.3.2.2 Die Elongation der Peptidsynthese

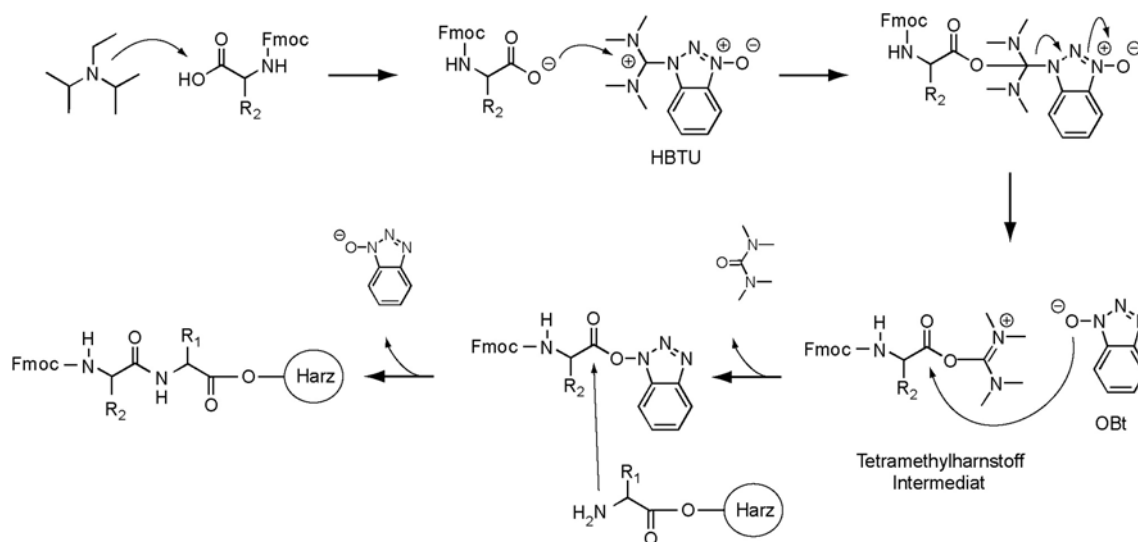
Um die Elongation der harzgebundenen Peptidkette um eine Aminosäure zu gewährleisten, ist eine Entschützung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe erforderlich. Nach Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe der terminalen Aminosäure unter Verwendung von 20% Piperidin in DMF für 10 min, kann die nächste Aminosäure an den freien N-Terminus des harzgebundenen Peptids gekuppelt werden. Dabei kann die Base Piperidin ein Proton unter Ausbildung eines stabilisierten Fluorenyl-Carbanions abstrahieren. Durch nachfolgende Eliminierung und CO<sub>2</sub>-Abgabe entsteht die freie terminale Aminogruppe (siehe Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Die Entschützung der Fmoc-geschützten Aminosäuren**

Die chemische Synthese der Amidbindung erfordert eine Aktivierung der Carboxylgruppe der  $\text{N}^\alpha$ -geschützten Aminosäure. In dieser Arbeit wurde die Aktivierungsreaktion *in situ* durchgeführt, d.h. die aktivierte Spezies wird während der Peptidknüpfung intermediär gebildet. Dies gelingt durch den Einsatz des Kupplungsreagenzes O-Benzotriazol-N,N,N',N'-Tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) mit dem Additiv N-Hydroxybenzotriazol (HOBt). Die Carboxylgruppe der Aminosäure wird zuerst durch einen großen Überschuss N-N-Diisopropylethylamin (DIPEA) quantitativ deprotoniert. Daraufhin greift das gebildete Nukleophil das elektrophile Carbenium-Ion des HBTUs an. Unter Austritt der Benzotriazolyl-Abgangsgruppe entsteht ein sehr reaktives Tetramethylharnstoff-Intermediat, welches wiederum nukleophil durch HOBt attackiert wird. Es bildet sich ein Benzotriazolyl-Ester, der die eigentliche aktive Spezies bei der Peptidbindungsbildung darstellt. Der freie N-Terminus des harzgebundenen Peptides verdrängt die

Benzotriazolyl-Abgangsgruppe des Aktivesters, wodurch die Peptidkette um eine Aminosäure elongiert wird (siehe Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Schematischer Ablauf der Aminosäuren-Aktivierung und Peptid-Elongation**

#### 4.3.2.3 Die Termination der Peptidsynthese

Die Abspaltung des fertigen Seitenketten-geschützten Peptids vom säurelabilen Chlorotriptyl-Linker gelingt durch Zusatz eines Abspaltgemisches aus AcOH/TFA/DCM (1:2:7). Das abgespaltene Peptid wird durch Filtration vom Harz getrennt und durch Umkristallisation in Hexan gereinigt.

#### 4.3.3 Synthese der SNAC und Thiophenol Thioester

Die Synthese aller in dieser Arbeit vorliegenden linearen Peptidthioester-Substrate mit den Abgangsgruppen SNAC und Thiophenol erfolgte durch Aktivierung des peptidischen C-Terminus.<sup>[59, 96]</sup> Um dieses chemoselektiv zu erreichen, wurde die Aktivierung am vollständig seitenkettengeschützten Peptid durch den Einsatz von 2 Äquivalenten DCC und dem Additiv HOBt in THF durchgeführt. Die durch  $K_2CO_3$  deprotonierte Carboxyl-Gruppe des seitenkettengeschützten Peptides addiert an die

C=N-Doppelbindung des DCC unter Entstehung des O-Acylisoharnstoffs. Dieses Intermediat ist instabil und wird durch Zugabe von HOBt in den wesentlich stabileren Benzotriazolyl-Ester überführt. Die gute Benzotriazolyl-Abgangsgruppe kann anschließend durch den Einsatz des Nukleophiles SNAC, bzw. Thiophenol (10 Äquivalente), unter Rühren bei Raumtemperatur für 3 h substituiert werden. Anschließend wird das THF am Rotationsverdampfer entfernt. Die Entschützung der säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen erfolgt unter stark sauren Bedingungen. Ein Gemisch aus TFA/H<sub>2</sub>O/Triisopropylsilan (95%: 2,5%: 2,5%, v/v) erlaubt die quantitativen Entschützung nach 3 h. Der in 95%iger TFA-Lösung vorliegende, vollständig entschützte Peptidthioester wurde in eiskaltem Diethylether gefällt. Die Reinigung des in Wasser/MeCN (90%: 10%, v/v) gelösten Peptidthioesters erfolgte durch präparative Reversed-Phase-HPLC mittels einer C<sub>18</sub>ec-Nucleodur-Säule. Die Identität der gereinigten Peptidthioester wurde durch MALDI-TOF verifiziert.

#### 4.3.4 Synthese der Bacitracin Dipeptid Bausteine

Die Synthese der in dieser Arbeit beschriebenen N-terminalen heterozyklischen Dipeptide, die als Bausteine in der SPPS nach beschriebenem Elongations-Schritt an das Bacitracin Decapeptid gekuppelt wurden, erfolgte nach den folgenden Synthesevorschriften. Die einzelnen Syntheseschritte sind in Abbildung 4.4 wiedergegeben.

##### 4.3.4.1 Die Synthese des Thiazolin Bausteines (1):

N-Boc-L-Isoleucin-OH (2.31 g, 10.0 mmol), N-Ethoxy-carbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) (2.72 g, 11.0 mmol) und Ammoniumhydrogencarbonat NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (2.37 g, 30.0 mmol) wurden in 25 mL trockenem Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) suspendiert und unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur 12 h gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde diese zwei Mal mit 15 mL H<sub>2</sub>O gewaschen und die organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt. Das resultierende N-Boc-L-Isoleucinylamid (1.84 g, Ausbeute 80%) wurde in Ethylacetat-Hexan (1:1, v/v) umkristallisiert, filtriert und lyophilisiert.<sup>[124]</sup> Das als Feststoff vorliegende Amid (1.79 g, 7.8 mmol) wurde in 20 mL trockenem Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gelöst und mit Triethyloxonium-Hexafluorophosphat (EtO<sub>3</sub><sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup>) (2.22 g, 8.9 mmol) versetzt.

Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei RT gerührt und anschließend mit gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung ( $K_2CO_3$ ) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (NaCl) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat ( $MgSO_4$ ) getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhielt man den 2(S)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-3(S)-methylpentanoiminoethylether als gelbliches Öl (1.90 g, Ausbeute 95%).<sup>[125]</sup> Die Lösung dieses Produktes (1.90 g, 7.4 mmol) in 12 mL trockenem  $CHCl_3$  wurde mit einer Lösung des L-Cystein-Methylesters (1.85 g, 10.7 mmol) in 9 mL trockenem Methanol (MeOH) vermischt und unter Argonatmosphäre bei 0°C für 2 h und anschliessend für weitere 36 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt wiederum in 50 mL trockenem  $CHCl_3$  gelöst. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit gesättigter  $K_2CO_3$ -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit  $MgSO_4$  getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Pentan:tert-butyl-Methylether, 2:1) gereinigt und man erhielt 2-[1'(S)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(S)-methylbutyl]-4(R)-(methoxycarbonyl)-thiazolin (1.60 g, 66% Ausbeute) als blasses gelbes Öl.<sup>[126]</sup> Um den Methylester zu spalten wurde das in 7 mL THF gelöste Produkt (0.57 g, 1.70 mmol) mit 6,8 mL einer 0.5 M Lithiumhydroxid-Monohydrat-Lösung (0.14 g in 6.8 mL  $H_2O$ ) versetzt und bei 0°C für 15 min und anschließend bei RT für eine weitere Stunde gerührt. Das THF wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Temperatur nicht über 5°C anstieg. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether gewaschen und direkt lyophilisiert. Die Identität des erhaltenen Lithiumsalzes von 2-[1'(S)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(S)-methylbutyl]-4-carboxy-thiazolin wurde durch FT-ICR und NMR Analyse bestätigt und ohne weitere Aufarbeitung in der SPPS verwendet:  $R_f = 0.26$  (silica gel,  $CHCl_3$ : MeOH: HCOOH 20:1:0.1).  $^1H$ -NMR<sup>[1]</sup> (300 MHz, 60:40  $D_2O$ : $CD_3CN$ , 23°C)  $\delta = 1.18$ -1.25 (m, 6H), 1.42-1.52 (m, 1H), 1.75 (s, 9H), 1.80-1.90 (m, 1H), 2.10-2.18 (m, 1H), 3.68 (dd, 1H), 3.88 (dd, 1H), 4.59 (d, 1H), 5.22 (dd, 1H); HRMS (ESI-FT-ICR): berechnet für  $C_{14}H_{23}N_2O_4S_1Li_1 [M+Na]^+$  339.1349, gefunden: 339.1352. Gesamtausbeute: 13%.

#### 4.3.4.2 Die Synthese des Thiazol Bausteines (2):

Das Reaktionsprodukt 2-[1'(*S*)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(*S*)-methyl-butyl]-4(*R*)-(methoxy-carbonyl)-thiazolin (0.66 g, 2 mmol) der Synthese des Thiazolin Bausteines (siehe 4.3.4.1) wurde in trockenem Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gelöst und diese Lösung in einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Der Lösung wurde 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (330  $\mu\text{L}$ , 2.2 mmol) zugesetzt und auf Eis 5 min gerührt ehe mit einer Septe tropfenweise Bromotrichloromethan ( $\text{BrCCl}_3$ ) (220  $\mu\text{L}$ , 2.2 mmol) zugegeben wurde, um die selektive Oxidation des Heterozyklus zu erzielen. Die Lösung wurde 3 h auf Eis gerührt und der Reaktionsablauf dabei durch DC-Analyse kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz wurde der Ansatz dreimalig mit 15 mL wässriger  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gewaschen und die wässrige Phase anschließend mit EtOAc ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan:EtOAc, 4:1) gereinigt und man erhielt 2-[1'(*S*)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(*S*)-methylbutyl]-4(*R*)-(methoxycarbonyl)-thiazole (1.60 g, 66% Ausbeute) als blasses gelbes Öl.<sup>[127]</sup> Die Spaltung des Methylesters (0.57 g, 1.70 mmol) wurde durch Lösen in 7 mL THF und Zugabe 0.5 M Lithiumhydroxid-Monohydrat-Lösung (0.14 g in 6.8 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) erzielt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 15 min bei 0°C gerührt und anschließend für eine weitere Stunde bei RT. Die Reaktion wurde durch DC-Analytik kontrolliert und nach quantitativer Umsetzung mit einer 1 M  $\text{NaHSO}_4$ -Lösung auf pH 4 eingestellt. Die resultierende Lösung wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt und die organischen Phasen mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Die Identität des resultierenden Produktes 2-[1'(*S*)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(*S*)-methylbutyl]-4-carboxy-thiazol (0.51 g, Ausbeute 95%) wurde durch FT-ICR und NMR Analyse bestätigt und ohne weiter Aufarbeitung in der SPPS verwendet:  $R_f = 0.21$  (silica gel,  $\text{CHCl}_3$ : MeOH:  $\text{HCOOH}$  20:1:0.1).  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 23°C)  $\delta = 0.80$ -1.00 (m, 6H, Ile- $\gamma$ ,  $\delta\text{CH}_3$ ), 1.16-1.73 (m, 11H, Ile- $\gamma\text{CH}_2$ , BOC- $\text{CH}_3$ ), 1.97-2.17 (m, 1H, Ile- $\beta\text{H}$ ), 4.82 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H, Ile- $\alpha\text{H}$ ), 8.28 (s, 1H, Thz-H);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 23°C)  $\delta = 11.6$  (Ile- $\delta\text{CH}_3$ ), 16.2 (Ile- $\gamma\text{CH}_3$ ), 25.9 (Ile- $\gamma\text{CH}_2$ ), 28.7 (BOC- $\text{CH}_3$ ), 40.7 (Ile- $\beta\text{CH}$ ), 59.0 (Ile- $\alpha\text{CH}$ ), 80.8 (BOC- $\text{C}_q$ ), 128.7, 148.3, 157.9, 164.1, 176.2; HRMS (ESI -FT ICR): berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_1$   $[M+\text{Na}]^+$  337.1192, gefunden: 337.1202. Gesamtausbeute: 41%.



#### 4.3.4.3 Die Synthese des Oxazol Bausteines (3):

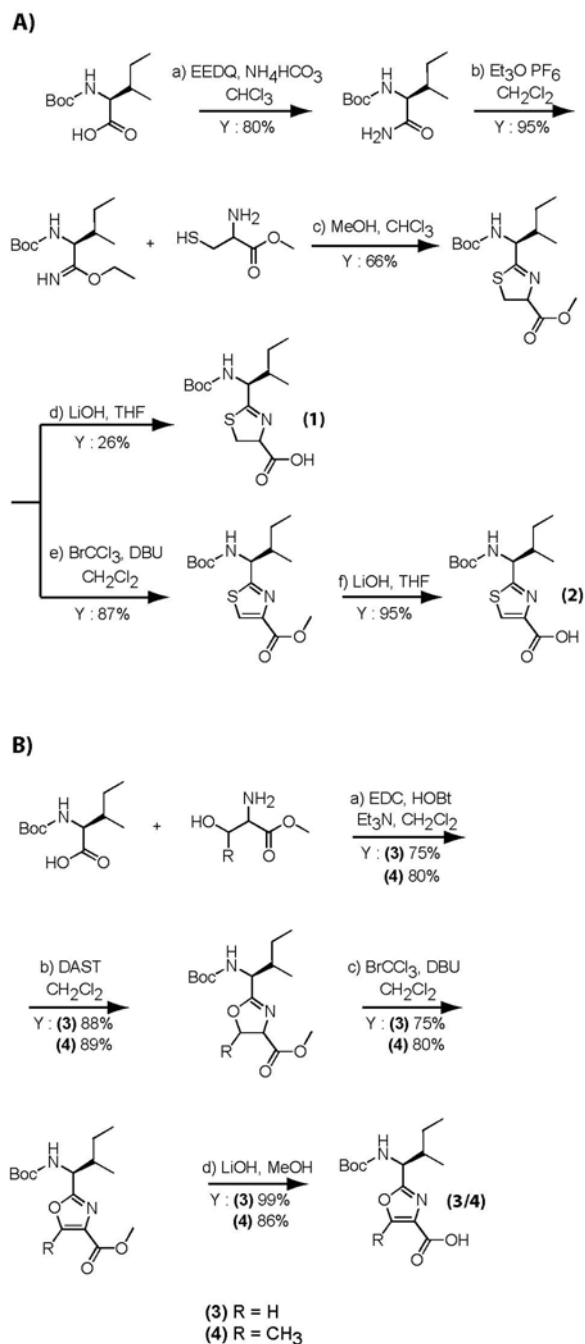
L-Serin-Methylester (2.15 g, 13.8 mmol), N'-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid (EDC·H<sub>2</sub>O) (2.80 g, 14.5 mmol) und 1-Hydroxy-1-H-benzotriazol (HOBt·H<sub>2</sub>O) (2.20 g, 14.5 mmol) wurden nacheinander in einer Lösung von N-Boc-L-Isoleucin-OH (3.20 g, 13.8 mol) in 25 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, gelöst. Die Lösung wurde unter Argonatmosphäre bei RT gerührt und nach 5 min mit frischem Triethylamin (Et<sub>3</sub>N) (3.90 mL, 27.6 mmol) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur 15 h gerührt und nach vollständiger Reaktion in 5 mL H<sub>2</sub>O gegeben und dreimalig mit 3 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 15 mL H<sub>2</sub>O gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Das resultierende Produkt wurde säulenchromatographisch (Hexan:EtOAc, 2:1) aufgereinigt und man erhielt das β-Hydroxyamid (3.29 g, Ausbeute 75%) als weissen Feststoff.<sup>[128]</sup> Diethylaminosulfur-Trifluorid (1.60 mL, 12.4 mmol) wurde tropfenweise, mittels einer Spritze, zu einer kalten (-78°C) Lösung dieses β-Hydroxyamids (3.75 g, 11.3 mmol) in 110 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei -78°C gerührt und anschließend mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.35 g, 16.9 mmol) versetzt und auf RT gebracht. Die Reaktion wurde mit Hilfe einer wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt und das Produkt aus dem biphasische System mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan:EtOAc, 2:1) gereinigt und man erhielt 2-[1'(S)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(S)-methylbutyl]-4(S)-(methoxycarbonyl)-oxazolin (3.30 g, Ausbeute 88%) als gelbliches Öl.<sup>[129]</sup> Diese Ester-Zwischenstufe (1.32 g, 4.20 mmol) wurde in 42 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und bei 0°C mit DBU (690 µL, 4.60 mmol) versetzt. Nach 5 min wurde Bromotrichloromethan (BrCCl<sub>3</sub>) (460 µL, 4.20 mmol) tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugegeben und für 6 h bei 0°C gerührt. Der Ansatz wurde dreimal mit 20 mL gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert, und *in vacuo* konzentriert, bevor sie säulenchromatographisch (Hexan:EtOAc 4:1) gereinigt wurde. Das Produkt 2-[1'(S)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(S)-methylbutyl]-4-(methoxycarbonyl)-oxazol (0.98 g, Ausbeute 75%) wurde als klares gelbliches Öl erhalten.<sup>[127]</sup> Dieser Oxazol-Methylester (1.66 g, 5.30 mmol) wurde anschließend in 30 mL MeOH

bei 0°C gelöst und mit einer wässrigen 0.5 M LiOH-Lösung (0.25 g in 10 mL H<sub>2</sub>O) versetzt. Dieses Gemisch wurde bei 0°C 30 min und anschließend bei RT weitere 30 min gerührt. Durch Reaktionskontrolle mittels DC-Analytik konnte der Umsatz des Oxazol-Eduktes verfolgt werden. Die Reaktion wurde mit Hilfe einer wässrigen 1 M NaHSO<sub>4</sub> gestoppt und auf pH 4 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde mit EtOAc ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Die Identität des gewünschten Produktes 2-[1'-(S)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'-(S)-methylbutyl]-4-carboxy-oxazol (1.57 g, Ausbeute 99%)<sup>[129]</sup> konnte durch FT-ICR und NMR Analyse bestätigt werden und das Produkt wurde ohne weiter Aufarbeitung in der SPPS verwendet. R<sub>f</sub> = 0.24 (silica gel, CHCl<sub>3</sub>: MeOH: HCOOH 20:1:0.1). <sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 23°C) δ = 0.83-0.96 (m, 6H, Ile-γ, δCH<sub>3</sub>), 1.14-1.33 (m, 1H, Ile-γCH<sub>2</sub>), 1.40 (s, 9H, BOC-CH<sub>3</sub>), 1.44-1.64 (m, 1H, Ile-γCH<sub>2</sub>), 1.86-2.08 (m, 1H, Ile-βH), 4.90 (m, 1H, Ile-αH), 6.33 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 9.83 (br s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 23°C) δ = 11.3 (Ile-δCH<sub>3</sub>), 15.3 (Ile-γCH<sub>3</sub>), 25.2 (Ile-γCH<sub>2</sub>), 28.3 (BOC-CH<sub>3</sub>), 39.3 (Ile-βCH), 53.6 (Ile-αCH), 80.0 (BOC-C<sub>q</sub>), 134.1, 144.5, 155.7, 164.0, 166.5; HRMS (ESI -FT ICR): berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 321.1421, gefunden: 321.1429. Gesamtausbeute: 49%.

#### 4.3.4.4 Die Synthese des Methyl-Oxazol Bausteines (4):

Die Synthese des Methyl-Oxazol Bausteines wurde analog zu der Synthese des Oxazol-Bausteines durchgeführt. L-Threonin-Methylester Hydrochloride (4.00 g, 23.8 mmol), EDC (4.80 g, 25 mmol) und HOBt·H<sub>2</sub>O (3.40 g, 25 mmol) wurden nacheinander zu einer Lösung von N-Boc-L-Isoleucin-OH (5.50 g, 23.8 mmol), gelöst in 42.5 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, gegeben und unter Argonatmosphäre 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde frisch destilliertes Et<sub>3</sub>N (6.60 mL, 47.6 mmol) zugegeben und die Reaktion für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der fertige Reaktionsansatz wurde mit 15 mL H<sub>2</sub>O versetzt und dreimal mit 8 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 40 mL H<sub>2</sub>O gewaschen mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Das resultierende Produkt wurde säulenchromatographisch (Hexan:EtOAc, 1.5:1) gereinigt und man erhielt das β-Hydroxyamid (6.60 g, Ausbeute 80%) als weißen Feststoff.<sup>[128]</sup> Dieser Feststoff (2.10 g, 6.0 mmol) wurde in 25 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und in einem Trockeneis/MeOH Bad auf -78°C gekühlt. Diethylaminosulfur-Trifluorid (0.90 mL, 6.60 mmol) wurde tropfenweise zugegeben und die Reaktion

unter Argonatmosphäre 1 h bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt, anschließend mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4.70 g, 33.8 mmol) versetzt und auf RT gebracht. Die Reaktion wurde mit Hilfe einer wässrigen  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gestoppt und das Produkt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan:EtOAc, 2:1) gereinigt und man erhielt 2-[1'(*S*)-(tert-Butyloxycarbonyl-amino)-2'(*S*)-methylbutyl]-4(*S*)-(methoxycarbonyl)-5-methyloxazolin (1.77 g, Ausbeute 89%) als farbloses Öl.<sup>[129]</sup> Dieser Methyl-Ester (0.99 g, 3.0 mmol) wurde in 30 mL trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und bei  $0^{\circ}\text{C}$  mit DBU (495  $\mu\text{L}$ , 3.3 mmol) versetzt. Nach 5 minütigem Rühren wurde für die selektive Oxidation tropfenweise  $\text{BrCCl}_3$  (330  $\mu\text{L}$ , 3.3 mmol) zugegeben und die Reaktion bei  $0^{\circ}\text{C}$  für 6 h gerührt. Nach vollständiger Entschützung wurde der Reaktionsansatz mit gesättigter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (3 x 15 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 10 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan:EtOAc, 4:1) gereinigt und man erhielt 2-[1'(*S*)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(*S*)-methylbutyl]-4-(methoxycarbonyl)-5-methyloxazol (0.78 g, Ausbeute 80%).<sup>[127]</sup> Dieser Ester (350 mg, 11.0 mmol) wurde in 4.5 mL MeOH gelöst und anschließend bei  $0^{\circ}\text{C}$  mit einer 0.5 M LiOH-Lösung (90 mg in 4.3 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei  $0^{\circ}\text{C}$  und anschliessend bei RT für weitere 30 min gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von wässriger  $\text{NaHSO}_4$  (1 M) gestoppt und auf pH 4 eingestellt. Nach Extraktion des Produktes mit EtOAc und Trocknung der organischen Phasen mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , wurde filtriert und *in vacuo* konzentriert. Man erhielt das Produkt 2-[1'(*S*)-(tert-Butyloxycarbonylamino)-2'(*S*)-methylbutyl]-4-carboxy-5-methyl-oxazol (284 mg, Ausbeute 86 %),<sup>[130]</sup> dessen Identität mit Hilfe von FT-ICR und NMR Analyse bestätigt werden konnte.  $R_f = 0.24$  (silica gel,  $\text{CHCl}_3$ : MeOH:  $\text{HCOOH}$  20:1:0.1).  $^1\text{H}$ -NMR: (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $23^{\circ}\text{C}$ )  $\delta = 0.81\text{--}0.96$  (m, 6H, Ile- $\gamma$ ,  $\delta\text{CH}_3$ ), 1.14-1.35 (m, 1H, Ile- $\gamma\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 9H, BOC- $\text{CH}_3$ ), 1.45-1.63 (m, 1H, Ile- $\gamma\text{CH}_2$ ), 1.90-2.05 (m, 1H, Ile- $\beta\text{H}$ ), 2.66 (s, 3H, Oxa- $\text{CH}_3$ ), 4.77-4.89 (m, 1H, Ile- $\alpha\text{H}$ ), 6.77 (br s, 1H), 11.18 (br s, 1H);  $^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $23^{\circ}\text{C}$ )  $\delta = 11.2$  (Ile- $\delta\text{CH}_3$ ), 12.0 (Oxa- $\text{CH}_3$ ), 15.3 (Ile- $\gamma\text{CH}_3$ ), 25.1 (Ile- $\gamma\text{CH}_2$ ), 28.3 (BOC- $\text{CH}_3$ ), 39.2 (Ile- $\beta\text{CH}$ ), 53.4 (Ile- $\alpha\text{CH}$ ), 79.6 (BOC- $\text{C}_q$ ), 127.1, 155.9, 156.9, 163.8, 164.6; HRMS (ESI -FT ICR): berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$  [ $M+\text{Na}$ ] $^+$  335.1577, gefunden: 335.1577. Gesamtausbeute: 49%.



**Abb. 4.4: Die Synthese der Bacitracin Dipeptid Bausteine:** (A) Synthese des Thiazolin-Bausteines und des Thiazol-Bausteines (B) Synthese des Oxazol(Ser)- und Oxazol(Thr) Bausteines: (A) (a) N-Boc-L-Ile-OH (1.0 Äqui.), EEDQ (1.1 Äqui.), NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (3.0 Äqui.), CHCl<sub>3</sub>, RT, 12 h; (b) Et<sub>3</sub>OPF<sub>6</sub> (1.1 Äqui.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C, 18 h; (c) L-Cys-Methylester (1.5 Äqui.), CHCl<sub>3</sub>, 0°C, 2 h und RT, 36 h; (d) LiOH (2.0 Äqui.), THF, 0°C, 1 h; (e) BrCCl<sub>3</sub> (1.1 Äqui.), DBU (1.1 Äqui.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°, 3 h; (f) LiOH (2.0 Äqui.), THF, 0°C, 15 Min und RT, 1 h. (B) (a) N-Boc-L-Ile-OH (1.0 Äqui.), L-Ser(Thr)-Methylester (1.0 Äqui.), EDC (1.1 Äqui.), HOBT (1.1 Äqui.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 5 Min; then Et<sub>3</sub>N (2.0 Äqui.), RT, 15 h (12 h); (b) DAST (1.5 Äqui.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C, 1 h; (c) BrCCl<sub>3</sub> (1.1 Äqui.), DBU (1.1 Äqui.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 C, 6 h; (d) LiOH (2.0 Äqui.), THF, 0°C, 15 Min und RT, 1 h.

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Assay der Zyklisierungs-Reaktion

Die Zyklisierungs-Aktivität, der in dieser Arbeit beschriebenen Enzyme, wurde in wässrigem Assay-Puffer (25 mM Hepes and 50 mM NaCl, pH 7.0) in einem Totalvolumen von 50  $\mu$ L bestimmt. In einem typischen Zyklisierungs-Assay wurde 250  $\mu$ M des Thioester-Substrates mit 1-10  $\mu$ M Enzym bei Raumtemperatur inkubiert. Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion verfolgen zu können, wurde die Zyklisierungs-Reaktion durch Zugabe des Enzyms initiiert und die Aktivität nach definierten Zeitpunkten durch Zugabe von 35  $\mu$ L TFA-Lösung (4% v/v) gestoppt. Die Reaktionsgemische wurden anschließend durch analytische HPLC-MS (*Agilent1100*) quantitativ auf ihre Produktbildung untersucht. Dabei wurde das gesamte Produktgemisch auf eine Reverse Phase (RP)-C<sub>18</sub>ec Nucleodur Säule 125/3 (*Macherey and Nagel*) bei einer Flussrate von 0,7 mL Min<sup>-1</sup> (Bac-PCP-TE), eine RP-C<sub>18</sub>ec Nucleodur Säule 250/3 (*Macherey and Nagel*) mit einer Flussrate von 0,3 mL min<sup>-1</sup> (Srf-TE und Mutanten, SLP<sub>3</sub>-SNAC) oder eine Zorbax Rx-C8 (*Agilent*) mit einer Flussrate von 0,8 mL min<sup>-1</sup> (Srf-TE und Mutanten, NH<sub>2</sub>-SLP-Thioester) aufgetragen und durch folgende Gradienten getrennt:

Bac-PCP-TE: 20%-50% MeCN (0.1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA), 20 min; Srf-TE und Srf-TE-Mutanten/SLP<sub>3</sub>-SNAC: 20%-60% MeCN (0.1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA), 30 min; Srf-TE+SrfTE-Mutanten/SLP-Thioester: 28%-55% MeCN (0.1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA), 30 min. Die Produkte wurden durch Absorption bei 215 nm und Massenanalyse (ESI-FT-ICR) nachgewiesen.

### 4.4.2 Assay der Zyklisierungs-Reaktion in organischen Lösungsmitteln

Um die enzymatische Zyklisierungsreaktion in organischen Lösungsmitteln beobachten zu können, wurde das lyophilisierte Enzym (siehe Abschn. 4.2.5) durch langsame Zugabe des gewünschten organischen Lösungsmittels (50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L) gelöst. 250  $\mu$ M des Thioester-Substrates wurden mit 1-5  $\mu$ M Enzym in einem Totalvolumen von 50  $\mu$ L des organischen Lösungsmittels bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Srf-TE Zyklisierungs-Reaktion in DMF erfolgte mit Hilfe einer RP-C<sub>18</sub>ec Nucleodur Säule 250-3 (Srf-TE) bei einer Flussrate von 0,3 mL min<sup>-1</sup> oder einer

Zorbax Rx-C8 (Srf-TEA<sub>81</sub>S) mit einer Flussrate von 0,8 mL pro min. Die Trennung des Produktgemisches konnte durch folgenden Gradienten erzielt werden: 20% MeCN (0,1% TFA) isokratisch, 10 min und anschließend 20%-60% MeCN (0,1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), 30 Minuten. Der Zyklisierungs-Assay des Thioester-Substrates SLP<sub>WT</sub>-SNAC in DMF wurde auf einer RP-C<sub>8</sub> Nucleosil 120-3 Säule bei einer Flussrate von 0,3 mL min<sup>-1</sup> analysiert. Hierzu wurde die Säule 5 min mit 60% Methanol isokratisch gespült und nachfolgend ein Gradient 60%-95% MeOH (0,1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) über 30 min angelegt.

#### 4.4.3 Assay der Zyklisierungs-Reaktion in ionischen Flüssigkeiten

Durch Zugabe von 100 µL der gewünschten ionischen Flüssigkeit zum lyophilisierten Enzym konnte dieses in den meisten Fällen suspendiert werden. 150 µM des Thioester-Substrates wurden mit 10 µM Enzym in einem Totalvolumen von 50 µL der ionischen Flüssigkeit bei Raumtemperatur für 3 h inkubiert. Um die Srf-TE Zyklisierungs-Reaktion in den ionischen Flüssigkeiten zu verfolgen, wurde das Reaktionsgemisch auf eine RP-C<sub>18</sub> Nucleodur Säule 250-3 bei einer Flussrate von 0.3 mL min<sup>-1</sup> aufgetragen. Das Produktgemisch wurde durch folgenden Gradienten getrennt: 10 min isokratisch mit 10% MeCN (0,1% TFA) und anschließend 10%-70% MeCN (0,1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0,1% TFA), 45 min.

#### 4.4.4 Bestimmung der kinetischen Parameter der Zyklisierungs-Reaktion

Die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $k_{cat}$  der Enzyme wurde analog der beschriebenen Assays bei Raumtemperatur (Bac-PCP-TE) oder bei 37°C (Srf-TE und Srf-TE Mutanten) durchgeführt. Dazu wurden die Substratkonzentrationen des Thioester-Substrates von 50 µM bis 1 mM variiert. Die Enzymkonzentration betrug jeweils 1 µM (Bac-PCP-TE), 2,5/10 µM (SrfTE in H<sub>2</sub>O), 10 µM (Srf-TE und Mutanten in DMF). Die  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Parameter ließen sich durch Analyse der Anfangsgeschwindigkeiten der Zyklisierung und Hydrolyse bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen nach dem Michaelis-Menten-Modell unter Verwendung des Programmes SigmaPlot (Enzyme Kinetics Modul) errechnen.

#### 4.4.5 Semi-Präparative Synthese der zyklischen Bacitracin-Derivate

Für die semipräparative Herstellung der zyklischen Bacitracin-Derivate wurden 300  $\mu\text{M}$  des Thioester-Substrates und 5  $\mu\text{M}$  Bac-PCP-TE bei RT in einem Totalvolumen von bis zu 8 mL inkubiert. Die Reaktion wurde nach einer Stunde durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  TFA-Lösung (4% v/v) gestoppt und die zyklischen Produkte durch Auftragen auf eine RP-C<sub>18</sub> Nucleodur 250/21 Säule (*Macherey and Nagel*) und Anlegen des folgenden Gradienten bei einer Flussrate von 12 mL min<sup>-1</sup> isoliert: 20%-50% MeCN (0.1% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.1% TFA), 30 min. Die isolierten Produkte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Trockene lyophilisiert.

#### 4.4.6 Biologische Aktivitätsbestimmung

Die zyklischen Bacitracin-Derivate, inklusive des Standards Bacitracin A (Bac<sub>Ref</sub>) als Referenz, wurden durch eine serielle Zweifachverdünnung (MeOH) auf definierte Konzentrationen eingestellt.<sup>[94]</sup> In sterilen Mikrotiterplatten (*Nunc*) wurde eine definierte Menge der zyklischen Produkte mit 80  $\mu\text{L}$  einer Bakterienkultur (1:10000 Verdünnung einer Übernachtskultur) des Stammes *B. subtilis* PY 79 überschichtet. Um die Aktivität der Substrate zu gewährleisten, wurde das verwendete LB-Medium mit 67.6 mg Zn<sup>2+</sup>/L ergänzt. Die visuelle Bestimmung der MHK-Werte erfolgte nach Inkubation über 20 h bei 37°C.

### 4.5 Analytische Methoden

#### 4.5.1 Allgemeine analytische Methoden

Die Produktbildung sowie der Reaktionsverlauf der chemischen Synthesen wurde durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf glaskaschierten 0.25 mm E. Merck Silikagel-Platten (60F-254, *Merck*) mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub> verfolgt. Zur Detektion wurde UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) verwendet und die Platten mit einer ethanolischen Phosphomolybdänsäure-Lösung als Färbereagenz und anschließendem Erhitzen angefärbt. Die in dieser Arbeit hergestellten Produkte wurden mittels Flush-Säulenchromatographie gereinigt. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm, 70-230 mesh ASTM) der Firma Merck. Die

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden an Advance AC-300 Spektrometern der Firma Bruker vermessen. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) ist in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten (J) in Hz. Als interner Standard für die  $^1\text{H}$ -Spektren dienten die Restprotonensignale der Lösungsmittels  $\text{CDCl}_3$ . Die Multiplizitäten sind wie folgt angegeben: (s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qu = Quintett, h = Heptett, p = pseudo, br = breit).

#### 4.5.2 Massenspektrometrie

Die Identität aller Substrate und Produkte dieser Arbeit wurden durch massenspektrometrische Analysen verifiziert.

##### 4.5.3.1 HPLC-MS

Zur Charakterisierung und Trennung der in dieser Arbeit beschriebenen Substrate und Produkte wurde Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) verwendet. Die untersuchten Substanzgemische wurde dabei auf Reverse-Phase-Säulen ( $\text{C}_{18}$  oder  $\text{C}_8$  beschichtetes Silikagel) getrennt und durch einen graduellen Anstieg des Acetonitril-Wasser-Verhältnisses eluiert. Die Retentionszeiten wurden durch Messung der Absorption bei 215 nm bestimmt. Die Kopplung mit einem Singel-Quadropol-Elektrospray-Ionization-Massen-Detektor (ESI) erlaubte die direkt massenspektrometrische Analyse der Produkte im  $m/z$ -Bereich von 500 bis 1800, wobei die Ionisierung der analytischen Produkte durch Zusatz von 0.1% TFA im Laufmittel sichergestellt werden konnte. Die Auswertung der HPLC-MS Analyse erfolgte mit dem Program ChemStation (*HewlettPackard*)

##### 4.5.3.2 MALDI-TOF-MS

Die Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie erlaubt die Bestimmung der molekularen Massen eines Peptides im Hochvakuum. 1  $\mu\text{L}$  der Peptid-Lösung wurde mit 1  $\mu\text{L}$  einer Dihydroxy-Benzoat (DHB)-Matrix (*Agilent Technologies*) vermischt und auf eine metallische 384-Probenplatte pipettiert. Die kokristallisierten Proben wurden mit Hilfe eines „Bruker BiFlex4“ (Bruker Daltonics) analysiert.



#### 4.5.3.3 FT-ICR-Massenspektrometrie

Die exakte Massenfeinbestimmung der Substrate und Produkte und die Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) zur Aufklärung der Regiospezifität der zyklischen Produkte wurden in einem Finigan LTQ FT-ICR (Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz) Massenspektrometer durchgeführt. Durch eine Cyclotron-Kreisbewegung können hierbei im homogenen Magnetfeld eines supraleitenden Magneten angeregte Ionen zwischen zwei Elektroden einen Wechselstrom induzieren, dessen Frequenz genau der Orbitalfrequenz der zu bestimmenden Ionen entspricht und proportional  $m/z$  ist. Das frequenzabhängige Spektrum aller angeregten Ionen kann nun mit Hilfe der Fourier-Transformation in ein Massenspektrum umgerechnet werden.

## 5 Ergebnisse

Die chemoenzymatische Synthese zyklischer Peptide durch Kombination von Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) und isolierten nichtribosomalen Peptidzyklasen (TE-Domänen) hat sich als eine effektive Methode zur Herstellung von nichtribosomal erzeugten Peptiden und deren Derivate erwiesen und bildet die Grundvoraussetzung für diese Arbeit.<sup>[93]</sup> Die Ergebnisse stellen einen Beitrag zur Optimierung der enzymkatalysierten Zyklisierungsreaktion der NRPS-Zyklasen dar. Im ersten Abschnitt (Abschnitt 5.1) des vorliegenden Kapitels wird *in vitro* das Zyklisierungs-Potential der freistehenden Bacitracin-Zyklase zur Erzeugung neuartiger Bacitracin-Derivate beschrieben. Dabei konnte nicht nur authentisches Bacitracin A durch einen chemoenzymatischen Ansatz hergestellt werden, sondern auch eine einfache und effektive Methode zur Herstellung von bioaktiven Bacitracin-Derivaten entwickelt werden.

Der zweite Abschnitt (Abschnitt 5.2) beschäftigt sich mit dem Problem der Hydrolyse als Konkurrenzreaktion der Zyklisierungsreaktion. Im Rahmen meiner Untersuchungen konnte ich zeigen, dass durch die Substitution des wässrigen Lösungsmittels mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel oder einer ionischen Flüssigkeit diese Nebenreaktion verringert oder sogar vollständig eliminiert werden kann (*Solvent Engineering*).

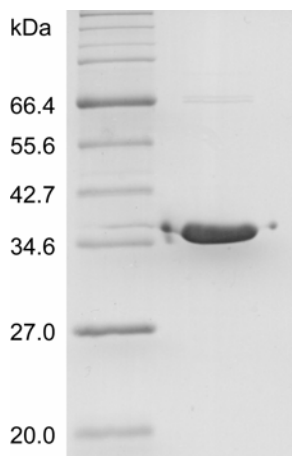
Der dritte und letzte Abschnitt (Abschnitt 5.3) behandelt die rationale Veränderung (*Rational Protein Engineering*) der katalytischen Eigenschaften einer ausgewählten Thioesterase. Die dabei untersuchte Zyklase (Srf-TE) des Surfactin Biosynthesystems katalysiert den intramolekularen nukleophilen Angriff einer Hydroxyl-Funktion auf das Carbonyl-C-Atom des Acyl-O-Enzym Oxoesters unter Ausbildung eines Makrolaktons. Eine Substitution dieser Hydroxyl-Funktion durch eine Aminofunktion wird dabei zur Ausbildung eines Surfactin Makrolaktams führen.

## 5.1 Die chemoenzymatische Entwicklung neuer Bacitracin-Derivate

Eine starke Limitation der systemischen Applikation von Bacitracin A ist dessen Metabolismus im menschlichen Körper zu Bacitracin F. Dieser reaktive Metabolit führt durch Ausbildung einer kovalenten Bindung innerhalb verschiedener Proteasen zu schwerwiegenden hepatotoxischen und nephrotoxischen Nebenwirkungen und beschränkt Bacitracin A auf eine die topische Applikation.<sup>[50]</sup> Um das Problem der metabolischen Umsetzung von Bacitracin A in Bacitracin F zu verhindern, war es Ziel meiner Arbeit durch eine chemoenzymatische Synthese unterschiedliche Bacitracin-Derivate zu generieren und eine Technik zur schnellen und einfachen Derivatisierung des Grundmoleküls Bacitracin A zu etablieren. Darüberhinaus sollte die Veränderung des metabolischen Profils bei gleichzeitiger Bewahrung der antibiotischen Eigenschaften des Bacitracin A erzielt werden.

### 5.1.1 Produktion der Bacitracin PCP-TE Didomäne

In den letzten Jahren haben zahlreiche Publikationen die erfolgreiche Verwendung von freistehenden NRPS-Thioesterasen für die Produktion von makrozyklischen Produkten und deren Derivaten beschrieben.<sup>[19]</sup> Um die chemoenzymatische Zyklisierungsaktivität der rekombinanten Bacitracin-Zyklase mit artifiziellen linearen Bacitracin-Thioester-Substraten nutzen zu können, wurde das entsprechende *bac-pcp-te* Gen Fragment des Bacitracin Biosynthesesystems aus

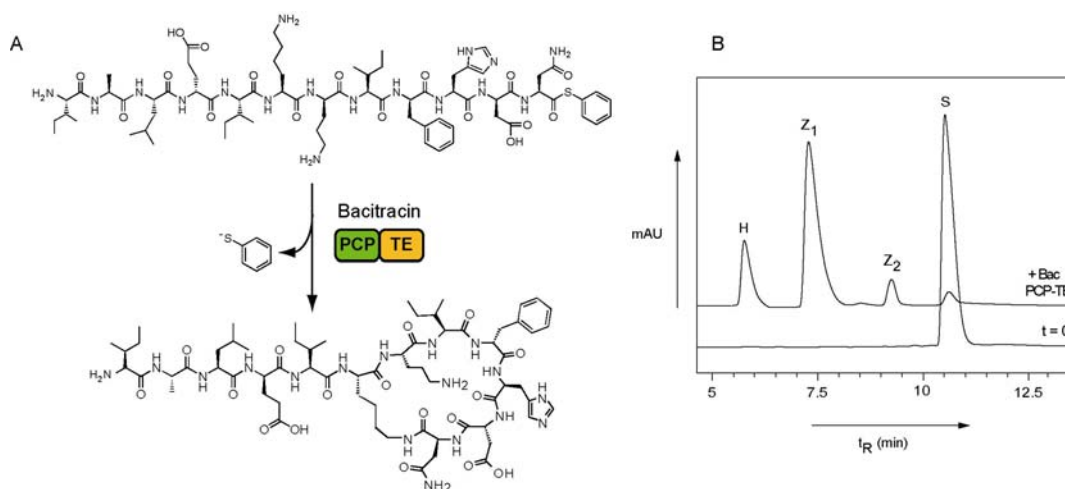


**Abb. 5.1:** SDS-PAGE (12,5%) Analyse der gereinigten Bac-PCP-TE (36,4 kDa) Didomäne. Das Enzym wurde in *E. coli* M15 Zellen produziert und durch  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Affinitäts-Chromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. Anfärbe-Reagenz: Coomassie Blau.

der chromosomalen DNA von *Bacillus licheniformis* ATCC10716 amplifiziert und die rekombinante Zyklase heterolog in *E. coli* produziert. Aufgrund früherer Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass eine korrekte Faltung des N-Terminus der Zyklase für die optimale Zyklisierungsaktivität erforderlich ist, wurde diese als bidomänales Konstrukt (Bac-PCP-TE) produziert.<sup>[56]</sup> Nach erfolgreicher Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie konnte Bac-PCP-TE (36,4 kDA), mit einer Ausbeute von 8,7 mg/L, als lösliches Protein erhalten werden (siehe Abb. 5.1).

### 5.1.2 Die Zyklisierungsreaktion der Bac-PCP-TE

Grundvoraussetzung für den Einsatz der Bac-PCP-TE in diesen Untersuchungen ist deren Fähigkeit, eine Makrozyklisierung von linearen Bacitracin-Thioester-Substraten zu katalysieren. Da der N-terminale heterozyklische Teil (NH<sub>2</sub>-Ile-Thiazolin-OH) des natürlichen Bacitracin A Substrates kommerziell nicht erhält ist, wurde für die Charakterisierung der Zyklisierungsaktivität der Bac-PCP-TE ein Substrat-Analogon mit Hilfe der Festphasensynthese (siehe Kapitel 4.3.2) synthetisiert, in welchem die Position 2 (Thiazolin) des Moleküls durch ein L-Alanin substituiert ist (BLP-Ala<sub>2</sub>). Da die Aktivierung des Peptides mit einer N-Acetylcysteamin (SNAC) Abgangsgruppe eine nicht genügende Reaktivität zur Acylierung der Zyklase zeigte, wurde für die C-terminale Aktivierung eine Thiophenol-Abgangsgruppe gewählt.<sup>[96]</sup> In einem *in vitro* Assay wurde die rekombinante Bac-PCP-TE mit diesem Bacitracin-Substrat BLP-Ala<sub>2</sub> umgesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h konnte durch anschließende HPLC-MS Analyse des Produktgemisches die gewünschte Produktbildung beobachtet werden (siehe Abb. 5.2B). Die Identität aller auftretender zyklischen Produkte wurde mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse (FT-ICR-MS) bestätigt (siehe Tab. 5.1). Interessanterweise zeigte das Reaktions-Profil des BLP-Ala<sub>2</sub>-Substrates zwei zyklische Produkt-Signale, die zwar unterschiedliche Retentionszeiten aber die gleiche Masse ( $m/z = 1407,8$ ) aufwiesen. Dieses Phänomen ist dadurch zu erklären, dass im linearen Bacitracin-Substrat zwei benachbarte Nukleophile, L-Lys<sub>6</sub> und D-Orn<sub>7</sub> zu finden sind, die beide als intramolekulare Nukleophile fungieren und die Oxoesterbindung des Acyl-O-TE Intermediates unter Bildung zweier regioisomerer Produkte angreifen können.



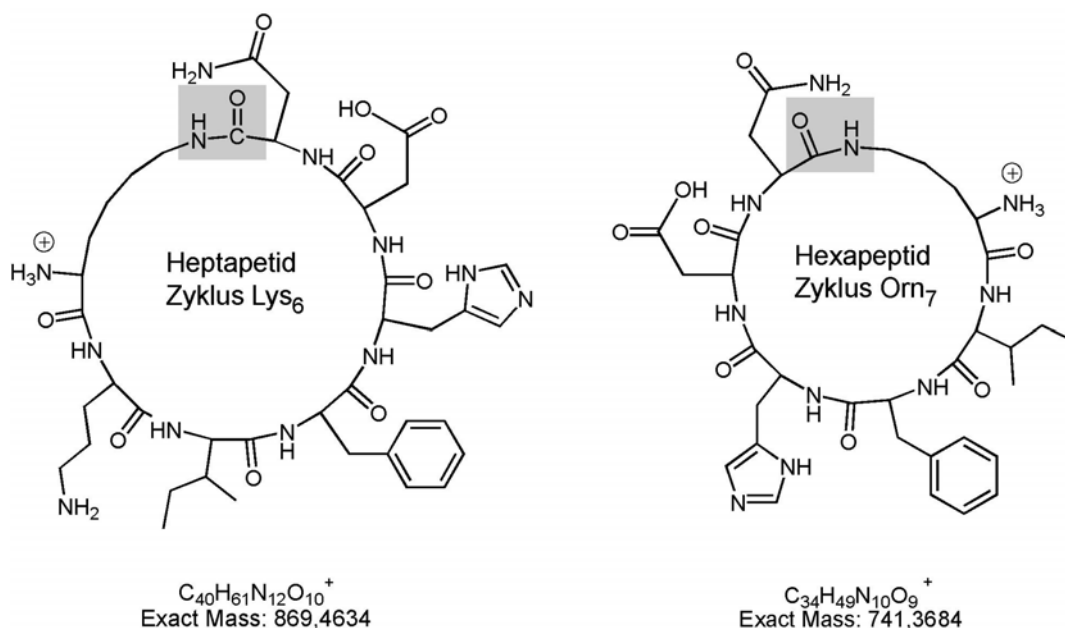
**Abb. 5.2: Die Zyklisierungsreaktion der Bac-PCP-TE:** (A) Schematische Darstellung der Bac-PCP-TE katalysierten Zyklisierungsreaktion. Das lineare Substrat (BLP-Ala<sub>2</sub>) wird nach Inkubation mit der Bac-PCP-TE in das cyclische Bacitracin-Derivat umgewandelt. (B) HPLC-Reaktionsprofil der Inkubation von 1  $\mu$ M Bac-PCP-TE, 200  $\mu$ M BLP-Ala<sub>2</sub> in Assay-Puffer bei RT für 1 h. Die entstandenen Signale entsprechen der freien Peptidsäure (H), der Zyklisierung über L-Lys<sub>6</sub> (Z<sub>1</sub>) und D-Orn<sub>7</sub> (Z<sub>2</sub>) und dem eingesetzten Substrat BLP-Ala<sub>2</sub> (S).

**Tabelle 5.1: Massenspezifische Charakterisierung der linearen Bacitracin Substrate und deren cyclische Produkte.**

Verbindung	Lineare Substrate (Da)			Zyklische Produkte (Da)		
	Spezies	Berechnet	Gefunden	Spezies	Berechnet	Gefunden
BacA <sub>Ref</sub>	Entf.*	Entf.	Entf.	$([M+Na]^+)$	1444,7382	1444,7385
BLP-Thia <sub>2</sub>	$([M+H]^+)$	1532,7680	1532,7698	$([M+Na]^+)$	1444,7382	1444,7406
BLP-Thaz <sub>2</sub>	$([M+H]^+)$	1530,7596	1530,7654	$([M+2H]^{2+})$	710,8739	710,8746
BLP-OxS <sub>2</sub>	$([M+H]^+)$	1514,7824	1514,7903	$([M+2Na]^{2+})$	724,8673	724,8689
BLP-OxT <sub>2</sub>	$([M+H]^+)$	1528,7981	1528,7986	$([M+2Na]^{2+})$	731,8751	731,8780
BLP-Ala <sub>2</sub>	$([M+H]^+)$	1518,8162	1518.8166	$([M+2Na]^{2+})$	726,8829	726,8842

\*Entf. = entfällt

Um die Identität der Produkte zu klären, wurden beide zyklische Produkte einer Tandem-MS-Analyse (ESI-IT-MS<sup>2</sup>) unterzogen. In dieser Produkt-Analyse, in welcher der Bacitracin-Zyklus nicht fragmentiert wurde, konnten alle fragmentierten Ionen des linearen Teil (L-Ile<sub>1</sub> bis L-Ile<sub>5</sub>) mit hohen Intensitäten detektiert werden.<sup>[131]</sup> Im Falle des Heptapeptid-Zyklus war das kleinste detektierte Fragment-Ion innerhalb der Serie der Zyklus mit der kalkulierten Masse von 869,4634, während für den Hexapeptid-Zyklus eine Masse von 741,3184 gefunden wurde (siehe Abb. 5.3). Durch dieses Fragmentierungsmuster konnte die Regiospezifität der erhaltenen Zyklen eindeutig bestimmt werden (siehe Tab. 5.2). Das HPLC-Signal mit der größeren Retentionszeit ( $t_R = 9,25$  Minuten) konnte dabei dem Angriff des internen Nukleophiles D-Orn<sub>7</sub> zugeordnet werden, während das dominante Signal mit der kleineren Retentionszeit ( $t_R = 7,14$  Minuten) dem Zyklus entspricht, der durch die gewünschte NH<sub>2</sub>-Seitenkettenfunktion des L-Lys<sub>6</sub> gebildet wird.



**Abb. 5.3: Die kleinsten Fragment-Ionen der Tandem-MS-Analyse der zyklischen Bacitracin-Regioisomere.** Durch das Auftreten zweier benachbarter Nukleophile in den linearen Bacitracin-Substraten kommt es in der Zyklisierungsreaktion zur Bildung zweier zyklischer Regioisomere. Durch den nukleophilen Angriff der Lys<sub>6</sub>-Aminofunktion bildet sich ein zyklischer Heptapeptid-Ring, während der alternative Angriff der Aminofunktion des Orn<sub>7</sub> zur Ausbildung eines Hexapeptid-Zyklus führt. Die Abbildung zeigt die kleinsten gefundenen Fragment-Ionen der Tandem-Massenspektrometrischen Analyse (ESI-IT-MS<sup>2</sup>).

**Tabelle 5.2: Die Tandem-MS-Analyse (ESI-IT-MS<sup>2</sup>) der zyklischen Produkte**

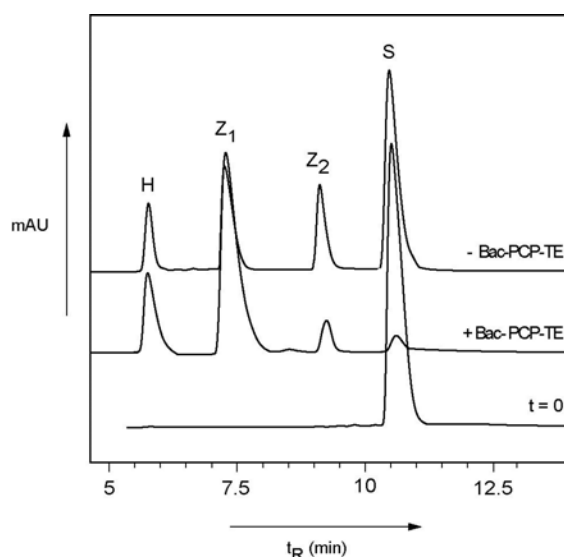
Verbindung	Kleinstes Fragment-Ion (m/z)	Strukturelle Identität	t <sub>R</sub>
BacAla <sub>2</sub> (Lys <sub>6</sub> )	869,46571	[M+H-(Ile <sub>1</sub> -Ala <sub>2</sub> -Leu <sub>3</sub> -Glu <sub>4</sub> -Ile <sub>5</sub> )] <sup>+</sup>	7,14
BacAla <sub>2</sub> (Orn <sub>7</sub> )	741,36992	[M+H-(Ile <sub>1</sub> -Ala <sub>2</sub> -Leu <sub>3</sub> -Glu <sub>4</sub> -Ile <sub>5</sub> -Lys <sub>6</sub> )] <sup>+</sup>	9,25
BacThia <sub>2</sub>	869,46577	[M+H-(Ile <sub>1</sub> -Thiazolin <sub>2</sub> -Leu <sub>3</sub> -Glu <sub>4</sub> -Ile <sub>5</sub> )] <sup>+</sup>	8,50
BacThaz <sub>2</sub>	869,46544	[M+H-(Ile <sub>1</sub> -Thiazol <sub>2</sub> -Leu <sub>3</sub> -Glu <sub>4</sub> -Ile <sub>5</sub> )] <sup>+</sup>	8,21
BacOxS <sub>2</sub>	869,46679	[M+H-(Ile <sub>1</sub> -Oxazol <sub>2</sub> -Leu <sub>3</sub> -Glu <sub>4</sub> -Ile <sub>5</sub> )] <sup>+</sup>	7,56
BacOxT <sub>2</sub>	869,46676	[M+H-(Ile <sub>1</sub> -Methyloxazol <sub>2</sub> -Leu <sub>3</sub> -Glu <sub>4</sub> -Ile <sub>5</sub> )] <sup>+</sup>	7,03

Das Verhältnis der enzymatischen Bildung dieser regioisomeren Makrolaktame wurde mit 7:1 zugunsten des gewünschten Heptapeptid-Zyklus ermittelt. Eine mögliche Ursache für die Bevorzugung dieses Nukleophils ist die Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche der Bacitracin-TE. Als weitere Untermauerung für das Vorkommen zweier Nukleophile wurden Bacitracin-Thiophenol-Substrate synthetisiert, in denen jeweils eines der beiden Nukleophile (BLP-O<sub>7</sub>A, BLP-K<sub>6</sub>A) durch Alanin substituiert wurde. Nach Inkubation mit Bac-PCP-TE konnte durch HPLC-MS-Analytik jeweils eindeutig nur die Bildung eines zyklischen Produktes nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde für das Bacitracin-Substrat (BLP-K<sub>6</sub>A/O<sub>7</sub>A), in dem beide Nukleophile durch Alanin substituiert wurden, keine zyklische Produktbildung beobachtet. In diesem Fall erfolgte zwar eine Substraterkennung durch Bac-PCP-TE, welche durch die Abwesenheit eines Nukleophiles allerdings nicht zu einer Zyklusbildung sondern zur Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters durch das externe Nukleophil H<sub>2</sub>O führte.

Für die weitere Charakterisierung der Zyklisierungsreaktion wurden kinetische Studien mit dem Substrat BLP-Ala<sub>2</sub> durchgeführt. Dabei wurde für die Zyklisierungsreaktion des Heptazyklus der Bac-PCP-TE eine Substrataffinität ( $K_M$ ) von 0,202 mM und eine Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) von 0,74 min<sup>-1</sup> ermittelt. Die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der Bac-PCP-TE für die Bildung des Heptapeptid-Zyklus (Bac-Ala<sub>2</sub>) beträgt 3,66 min<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> (siehe Tab. 5.3). Wie in den meisten Fällen der chemoenzymatischen Zyklisierungsreaktion wird auch in diesem Fall ein beträchtlicher Teil (34%) des eingesetzten Substrates hydrolytisch von der Zyklase gespalten und kann als freie lineare Peptidsäure nicht mehr zyklisiert werden.<sup>[54, 132]</sup> Der dadurch *in vitro* entstehende Produktverlust ist immens und kann nur durch den Ausschluss von

Wasser elimiert werden. Ansätze, die zur Eliminierung dieser Nebenprodukt-Bildung führen sollten, waren Gegenstand intensiver Untersuchungen die in Kapitel 5.2 vorgestellt werden.

Als weitere interessante Beobachtung des Reaktionsprofils der Zyklisierungsreaktion, konnte eine Zyklusbildung auch ohne enzymatische Inkubation nach einer Stunde beobachtet werden (siehe Abb. 5.4). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass lineare Peptidyl-Thiophenol-Substrate, bei Raumtemperatur, einer spontanen Autozyklisierung und Hydrolyse unterliegen können.<sup>[96]</sup>



**Abb. 5.4: Die unkatalysierte Zyklusbildung:** Reaktionsprofil der unkatalysierten Reaktion des Thiophenol-Substrat BLP-Ala<sub>2</sub> für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die unterste Spur entspricht dem HPLC-Diagramm des Substrates bei t=0, die mittlere Spur entspricht der katalysierten Reaktion nach Inkubation des Substrates mit Bac-PCP-TE, die oberste Spur entspricht der unkatalysierten Reaktion.

Durch die Ausbildung einer vorgefalteten Struktur<sup>[133]</sup> und der Reaktivität der Thiophenol-Abgangsgruppe kann der nukleophile Angriff eines internen Nukleophils die Bildung zyklischer Produkte ermöglicht. Die Autozyklisierung verläuft allerdings deutlich langsamer und weniger regiospezifisch als die enzymatische Zyklisierung. Das Verhältnis der beiden zyklischen Produkte liegt bei der enzymunabhängigen Zyklisierung mit 1,3:1 zugunsten des Heptapeptid-Zyklus und ist damit deutlich unspezifischer und beweist damit außerdem eindrucksvoll die Spezifität der enzymatischen Zyklisierung in der Wahl des Nukleophils.



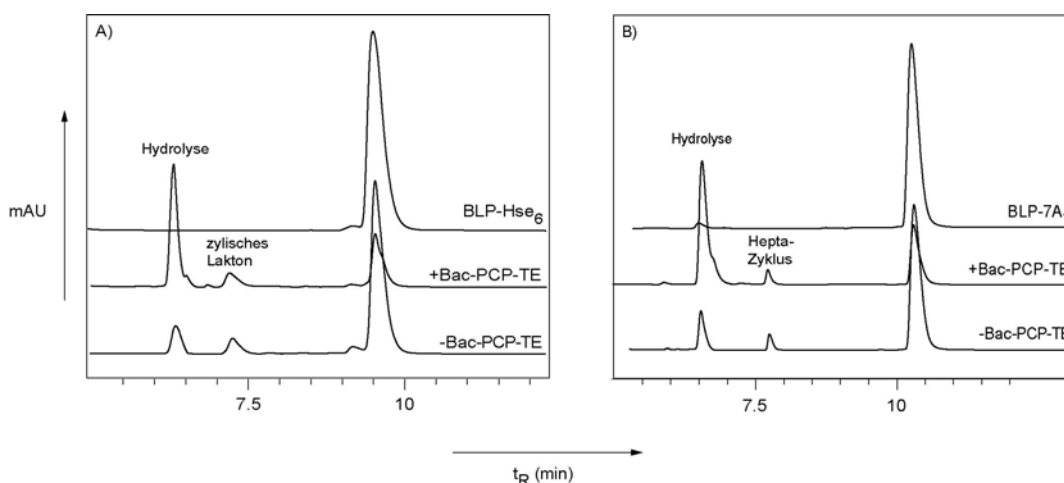
### 5.1.3 Untersuchungen zur Substrat-Spezifität der Bac-PCP-TE

Nachdem Bac-PCP-TE für die erfolgreiche Charakterisierung der Zyklisierungsreaktion von Bacitracin-Thioester-Substraten eingesetzt werden konnte war es von Interesse herauszufinden, ob die Konfiguration der Aminosäuren, die an der Zyklisierung beteiligt sind, einen entscheidenden Einfluss auf die Produktbildung hat. Zur Untersuchung der Stereoselektivität der Bac-PCP-TE wurden zwei Peptide synthetisiert, die entweder die Aminosäure D-Asn<sub>12</sub> am C-terminus des Peptides oder D-Lys<sub>6</sub> als Nukleophil enthielten. Um eine störende Nebenreaktion durch das Konkurrenz-Nukleophil D-Orn<sub>7</sub> auszuschliessen, wurde dieses durch D-Ala ersetzt. Inkubation dieser Peptidyl-Substrate (BLP-D-Asn<sub>12</sub> und BLP-D-Lys<sub>6</sub>) und anschließende HPLC-MS-Analyse resultierten in der völligen Aufhebung der zyklischen Produktbildung. In beiden Fällen konnte, wie bereits bei anderen chemoenzymatischen Zyklisierungsreaktionen beobachtet, nur die freie Peptidsäure im Reaktions-Profil identifiziert werden.<sup>[54, 134]</sup>

Von weiterem Interesse für die Substrat-Spezifität der Bac-PCP-TE war, ob eine Zyklusbildung auch über ein verändertes Nukleophil von der Zyklase katalysiert werden würde. Die Substitution der intramolekularen nukleophilen Aminofunktion des L-Lys<sub>6</sub> mit einer Hydroxyl-Funktion sollte so zu einer Ausbildung eines zyklischen Bacitracin-Lakton-Derivates führen. Hierfür wurde die Position des L-Lys<sub>6</sub> mit L-Homoserin substituiert und das D-Orn<sub>7</sub> wiederum durch D-Ala ersetzt. Das so erhaltene Peptidyl-Thiophenol-Substrat BLP-Hse<sub>6</sub> wurde anschließend für eine Stunde mit Bac-PCP-TE inkubiert. Im Reaktionsprofil der HPLC-MS-Analyse konnte keine enzymespezifische Makrolakton-Bildung beobachtet werden. Der Nachweis des zyklischen Makrolaktons im Reaktions-Profil ist ausschließlich auf eine enzymunabhängige Autozyklisierung des Substrates zurückzuführen, wie das Reaktionsprofil der Inkubation des Substrates ohne Enzym beweist (siehe Abb. 5.5A). Die enzymunabhängige Hydrolyse ist deutlich geringer als bei der Inkubation mit der Bac-PCP-TE. Da es sich im Falle des Homoserins um eine um zwei Methyleinheiten verkürzte Seitenkette gegenüber den natürlichen Nukleophil handelt, kann durch diese Untersuchung nicht endgültig auf eine Diskriminierung der Hydroxyl-Funktion als Nukleophil durch die Zyklase geschlossen werden.

Eine weitere Untersuchung bestand darin herauszufinden, ob der N-terminale Teil des angebotenen Peptidyl-Thioester-Substrates einen entscheidenden Einfluss auf die Zyklisierungseffizienz der Bac-PCP-TE haben würde. Hierfür wurde der

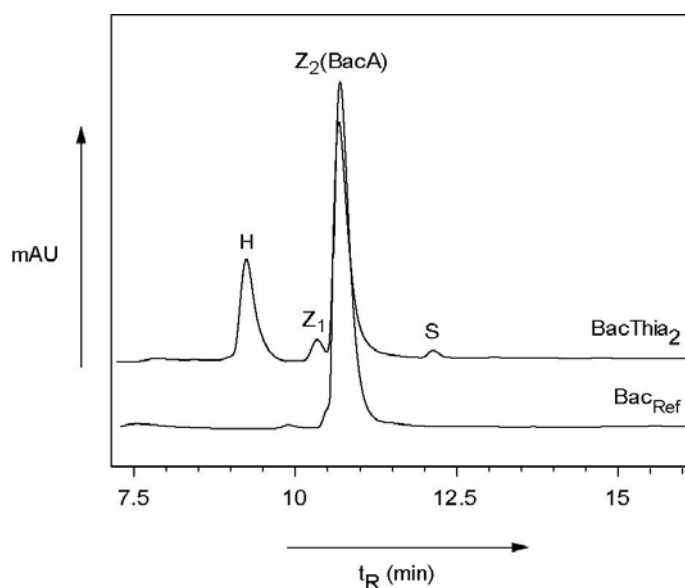
N-terminale Teil des angebotenen Substrat-Thioesters bis zum intramolekularen Nukleophil L-Lys<sub>6</sub> verkürzt und wiederum das zweite Nukleophil D-Orn<sub>7</sub> durch D-Ala<sub>7</sub> substituiert. Dieses heptapeptidische Substrat BLP-7A<sub>7</sub> wurde mit der Bac-PCP-TE für 1 h bei RT inkubiert und zeigt im HPLC-MS Reaktionsprofil (siehe Abb. 5.5B) wiederum nur eine enzymunabhängige Zyklusbildung. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schliessen, dass der N-terminale Teil des Substrates keinen entscheidenden Beitrag zur Substraterkennung der Zyklase liefert, allerdings ganz wesentlich an der richtigen Positionierung des Nukleophiles in der aktiven Tasche und damit der Zyklusbildung beteiligt ist.



**Abb. 5.5: Die Substrat-Spezifität der Bac-PCP-TE:** A) Reaktionsprofil der Inkubation von 1  $\mu$ M Bac-PCP-TE und 200  $\mu$ M BLP-Hse<sub>6</sub>. Im oberen Diagramm ist das Substrat bei t=0 gezeigt. Darunter die Umsetzung des Substrates mit der Zyklase und unten die Inkubation des Substrates ohne Zyklase für 1 h. Deutlich zu erkennen ist die enzymunabhängige Zyklisierung zum makrozyklischen Laktone-Derivat. B) Im oberen Diagramm ist wiederum das Substrat BLP-7A<sub>7</sub> bei t=0 gezeigt. Darunter die Umsetzung des Substrates mit der Zyklase und im untersten Diagramm die Inkubation des Substrates ohne Zyklase für 1 h. Auch hier ist nur die Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters in der enzymkatalysierten Reaktion zu beobachten. Die Zyklusbildung ist enzymunabhängig.

### 5.1.4 Die chemoenzymatische Bacitracin A Synthese

Die chemoenzymatische Zyklisierung des Substrates BLP-Ala<sub>2</sub> zeigt deutlich, dass das gewünschte makrozyklische Produkt durch den Einsatz der Bac-PCP-TE enzymkatalytisch in ausreichenden Mengen hergestellt werden kann. In diesem Zusammenhang war von entscheidendem Interesse, ob mit dieser Technik auch die Synthese des authentischen Bacitracin A möglich ist. Dabei gestaltet sich die Synthese des linearen Bacitracin A-Thiophenol-Substrates allerdings als schwierig, da Bacitracin A in Position 2 des Moleküls einen Thiazolin-Ring enthält, der kommerziell als Baustein für die Festphasen-Synthese nicht erhältlich ist. Die Synthese des Boc-L-Ile-Thiazolin-Bausteines (1) erfolgte entsprechend der Synthese von Lee et al. <sup>[126]</sup> aus N-Boc-L-Isoleucin und L-Cystein-Methylester (siehe Kapitel 4.3.4.1). Der synthetisierte Baustein wurde in einer konventionellen Festphasen-Kondensations-Reaktion an das Harz-gebundene Bacitracin-Decapeptid gekuppelt, welches anschließend C-terminal durch eine Thiophenol-Abgangsgruppe für die Zyklisierungsreaktion aktiviert wurde. Die Identität des synthetisierten linearen BacitracinA-Thiophenol-Substrates (BLP-Thia<sub>2</sub>) wurde durch FT-ICR-MS Analyse bestätigt (siehe Tab. 5.1) und das Substrat anschließend in einer Bac-PCP-TE katalysierten Zyklisierungsreaktion eingesetzt. Nach Inkubation mit Bac-PCP-TE für 1 h zeigt das HPLC-Reaktionsprofil die Bildung des gewünschten zyklischen Produktes ( $t_R=10.81$  min) Bacitracin A (BacThia<sub>2</sub>) (siehe Abb. 5.6).



**Abb. 5.6:**  
**Die chemoenzymatische Synthese von Bacitracin A:**

Das obere Diagramm zeigt das Reaktionsprofil der Inkubation von Bac-PCP-TE (1  $\mu$ M) mit dem linearen Bacitracin A-Thiophenol-Substrat (200  $\mu$ M).

Als Referenz ist im unteren Diagramm HPLC- gereinigtes kommerziell erhältliches Bacitracin A (Bac<sub>Ref</sub>) dargestellt. H = Hydrolyse, Z<sub>1</sub> = Hexapeptid-Zyklus, Z<sub>2</sub> = Bacitracin A, S = Substrat (BLP-Thia<sub>2</sub>).

Auffallend ist die fast vollständige Umsetzung dieses linearen Substrates durch die Bac-PCP-TE in das zyklische Produkt Bacitracin A. Das Verhältnis der beiden regioisomeren Zyklen liegt hierbei mit 91:1 zugunsten des heptapeptidischen Laktams deutlich über dem Verhältnis, dass für die Zyklisierung des linearen Bacitracin-Thiophenol-Substrates BLP-Ala<sub>2</sub> (7:1) ermittelt wurde (siehe Tab. 5.3). Die Zyklisierung über das ungewünschte Nukleophil L-Orn<sub>7</sub> ist fast vollständig aufgehoben. Als kinetische Parameter dieser authentischen Zyklisierungsreaktion wurde eine Substrataffinität ( $K_M$ ) von 0,197 mM und eine Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) von 0,79 min<sup>-1</sup> ermittelt. Die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der Bac-PCP-TE für die Bildung des nativen zyklischen Bacitracin A beträgt 4,01 min<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>. Die bessere Ausrichtung des Substrates in der aktiven Tasche der Bac-PCP-TE verglichen mit BLP-Ala<sub>2</sub> kann nicht nur durch eine höhere katalytische Effizienz belegt werden, sondern zeigt sich auch an einer Verringerung der Hydrolyse als Konkurrenz-Reaktion. BLP-Thia<sub>2</sub> zeigt eine Steigerung des Zyklisierungs-zu-Hydrolyse Verhältnis von 2,9 auf 3,8 im Vergleich zum linearen Substrat BLP-Ala<sub>2</sub> (siehe Tab. 5.3). Die Identität des chemoenzymatisch generierten Bacitracin A wurde durch FT-ICR-MS Analyse und Vergleich der Retentionszeiten mit gereinigtem kommerziellem Bacitracin A (BacA<sub>Ref</sub>,  $t_R$ =10.81 min) nachgewiesen.

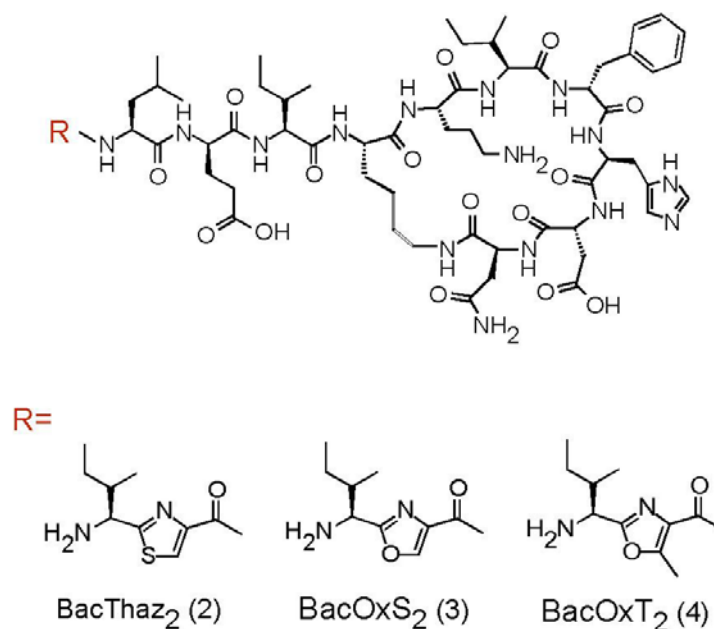
**Tabelle 5.3: Kinetische Parameter der Bac-PCP-TE vermittelten Zyklisierungsreaktionen\***

Verbindung	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat} / K_M$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	Zyklus/ Hydrolyse	Zyklus <sub>L7</sub> / Zyklus <sub>O6</sub>
BacThia <sub>2</sub>	0,197	0,79	4,01	3,8	91,0
BacThaz <sub>2</sub>	0,226	0,77	3,41	2,9	72,2
BacOxS <sub>2</sub>	0,248	0,70	2,94	4,6	8,1
BacOxT <sub>2</sub>	0,262	0,66	2,52	5,2	8,8
BacAla <sub>2</sub>	0,202	0,74	3,66	2,3	7,1

\*Alle Parameter wurden durch eine Dreifach-Bestimmung ermittelt.  
Die Werte entsprechen den Mittelwerten der unabhängigen Assays nach Abzug der Hydrolyse und Zyklisierung-Werte der spontanen unkatalysierten Produktbildung.  
Die Standardabweichung beträgt < 8% für alle Parameter.

### 5.1.5 Die chemoenzymatische Synthese der Bacitracin-Derivate

Gemäss der Strategie, eine kleine Substanz-Bibliothek zyklischer Bacitracin-Derivate zu generieren, sollte die Substitution des Thiazolin-Restes in Position 2 des Bacitracins durch drei oxidierte heterozyklische Ringe erfolgen (siehe Abb. 5.7).



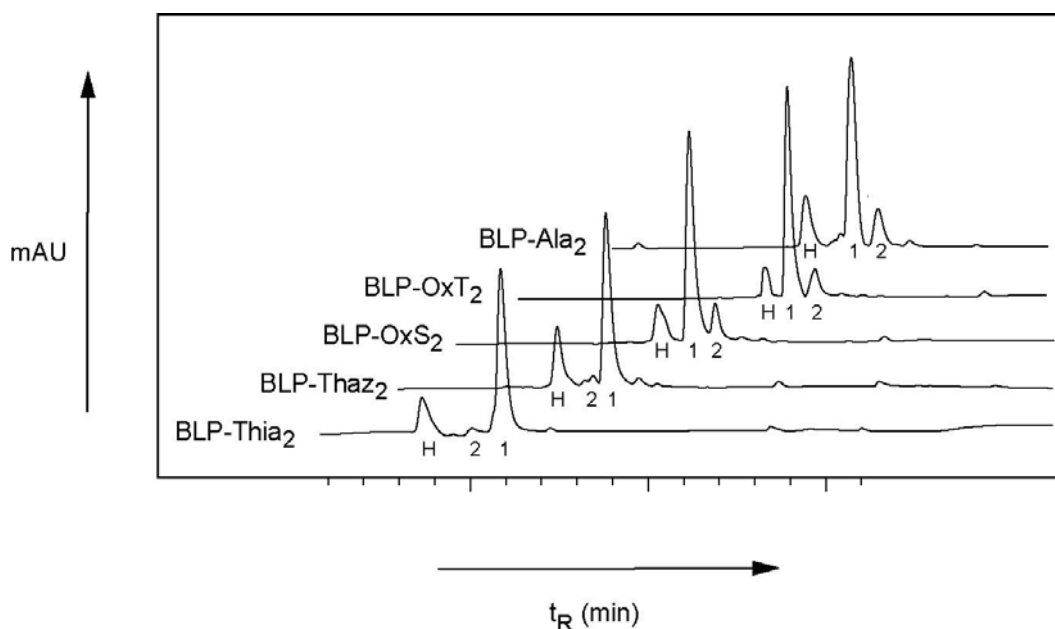
**Abb. 5.7: Übersicht der chemoenzymatisch erzeugten Bacitracin-Derivate.** Nach erfolgreicher Synthese der heterozyklischen Dipeptide, wurden diese an das lineare Dekapeptid des Bacitracin-Vorläufers gekoppelt und mittels der Bac-PCP-TE katalysierten Zyklisierungsreaktion zu zyklischen Bacitracin-Derivaten umgesetzt.

Da diese drei oxidierten Vorstufen ebenfalls nicht kommerziell erhältlich sind, wurde zunächst für die Synthese des Thiazol-Bausteins (2) die Thiazolin-Methylester Zwischenstufe mittels DBU und  $\text{BrCCl}_3$  oxidiert und anschließend C-terminal geschützt. Der erhaltene Baustein wurde in einer Festphasensynthese an das Bacitracin-Dekapeptid gekuppelt und ergab nach erfolgreicher C-terminaler Aktivierung das lineare Bacitracin-Thiophenol-Substrat BLP-Thaz<sub>2</sub>. Dieses Substrat konnte mit Hilfe der Bac-PCP-TE zum gewünschten zyklischen Bacitracin-Derivat BacThaz<sub>2</sub> umgesetzt werden (siehe Abb. 5.8). Anschließend wurden die kinetischen Parameter der Zyklisierungsreaktion des Substrats BLP-Thaz<sub>2</sub> bestimmt (siehe Tab. 5.3) und eine Substrataffinität ( $K_M$ ) von 0,226 mM und eine Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) von  $0,77 \text{ min}^{-1}$  erhalten. Die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) dieser

Zyklisierungsreaktion beträgt  $3,41 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  und das Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis 2,9. Auch das Verhältnis der beiden regioisomeren Zyklen ist im Vergleich zum authentischen Substrat BLP-Thia<sub>2</sub> mit 72:1 zugunsten des Heptapeptid-Zyklus nur leicht vermindert. Dieses spricht für einen möglichen Beitrag der heterozyklischen Oxidationsstufe zur optimalen Erkennung des Peptids in der aktiven Tasche der Zyklase.

Neben schwefelhaltigen fünfgliedrigen Heterozyklen (Thiazolidine, Thiazoline, Thiazole), sind auch sauerstoffhaltige Ringsysteme in vielen bioaktiven Naturstoffen zu finden.<sup>[135]</sup> Diese Heterozyklen können ebenfalls in der Lage sein, Komplexe mit zweiwertigen Ionen auszubilden. Da die Derivatisierung des Bacitracin A unter Beibehaltung der Fähigkeit zur Komplexbildung mit zweiwertigen Ionen erfolgen sollte, wurde versucht, neben eines Thiazol-Bausteines auch sauerstoffhaltige Heterozyklen in Position 2 des Bacitracins einzubauen, um somit die Bedeutung des Schwefels im Thiazolin-Ring näher zu untersuchen. Für die Synthese der dipeptidischen Oxazol(3)- und Methyloxazol(4)-Bausteine wurde die Synthesestrategie geringfügig verändert. Die einfache Umwandlung von  $\beta$ -Hydroxy-Aminosäuren in ihre korrespondierenden fünfgliedrigen Oxazoline ist in den letzten Jahren häufig durch den Einsatz von Diethylaminosulfurtrifluoride (DAST) beschrieben worden.<sup>[129]</sup> Diese Strategie wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Durch anschließende Oxidation mit DBU und BrCCl<sub>3</sub> konnten beide Oxazol-Bausteine in guten Ausbeuten hergestellt und an das Bacitracin-Dekapeptid gekuppelt werden. Durch anschließende Thiophenol-Aktivierung konnten die erzeugten linearen Bacitracin-Thiophenol-Substrate BLP-OxS<sub>2</sub> und BLP-OxT<sub>2</sub> erfolgreich mit Hilfe der Bac-PCP-TE in die gewünschte zyklische Form überführt werden (siehe Abb.5.8). Für diese Substrate ändert sich in der Bac-PCP-TE katalysierten Zyklisierungsreaktion nur das Verhältnis der beiden zyklischen Regioisomere. Einem Verhältnis von 8,1:1 für die Bildung des heptazyklischen BacOx<sub>2</sub>, steht ein ähnliches Verhältnis von 8,8:1 zugunsten des heptazyklischen BacOxT<sub>2</sub> Produktes gegenüber. Dieses lässt darauf schließen, dass auch die Substitution des authentischen Thiazolin-Ringes mit einem sauerstoffhaltigen Oxazol- bzw. Methyloxazol-Heterozyklus eine verminderte Erkennung des Substrates in der aktiven Tasche der Zyklase vermuten lässt. Die zusätzliche Methyl-Gruppe im Methyloxazol-tragenden BLP-OxT<sub>2</sub> zeigt allerdings keinen großen Unterschied in der Regioselektivität der Zyklase verglichen mit dem Oxazol-

tragenden Substrat. Auch die Substrataffinität der Zyklase ist mit einem  $K_M$  von 0,248 mM (BLP-OxS<sub>2</sub>) und 0,262 mM (BLP-OxT<sub>2</sub>) ebenfalls nicht deutlich verändert. Die katalytische Effizienz der Bac-PCP-TE der Zyklisierungsreaktion beider Substrate ist mit 2,94 min<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> für BLP-OxS<sub>2</sub> und 2,52 min<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> für BLP-OxT<sub>2</sub> allenfalls minimal verändert (siehe Tab. 5.3).



**Abb. 5.8: 3-Dimensionale Überlagerung der HPLC-Reaktionsprofile der Zyklisierungsreaktionen aller Bacitracin-Derivate.** Die gezeigten Signale entsprechen folgenden Produkten: H = Hydrolyse, 1 = heptazyklisches Hauptprodukt, 2 = hexazyklisches Nebenprodukt. Die Identität der dominanten heptazyklischen Produkte wurde durch Tandem-MS-Analyse für jedes Produkt bestätigt.

### 5.1.6 Die Bioaktivität der Bacitracin-Derivate

Um herauszufinden, ob die Substitution des heterozyklischen Thiazolin-Ringes im Bacitracin A Molekül eine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität hervorruft, wurden die zyklischen Bacitracin-Derivate auf ihre antibiotische Aktivität gegen den Indikatorstamm *Bacillus subtilis* PY 79 getestet. Alle zyklischen Derivate wurden in einem semi-präparativen Ansatz in größeren Mengen hergestellt. Das „Up-Scaling“ der Reaktion führte zwar zu einer Erniedrigung des heptazyklischen Hauptproduktes infolge einer verminderten Regiospezifität der Zyklase, allerdings konnten dieses trotzdem in zufriedenstellenden Quantitäten erhalten werden. Der Konzentrations-

vergleich der zyklischen Bacitracin-Derivate und des Bacitracin A wurde durch UV-Absorption-Messung anhand einer Kalibriergeraden, die mittels des Standards  $\text{BacA}_{\text{Ref}}$  erstellt wurde, erhalten. Die antibiotische Aktivität der einzelnen Verbindungen gegen *Bacillus subtilis* PY 79 wurde durch eine zweifache Verdünnungsreihe in 96-Mikrotiterplatten visuell bestimmt.<sup>[94]</sup> Gestützt auf Angaben früherer Studien, die eine Abhängigkeit der biologischen Aktivität des Bacitracins von zweiwertigen Ionen beschrieben, wurde zunächst in Vorversuchen die optimale Zink-Konzentration bestimmt. Der alleinige Zusatz von  $\text{ZnSO}_4$  zum Medium (80 mg/L) hatte keinen antibiotischen Effekt auf das bakterielle Wachstum. Erst durch Zugabe des Bacitracin-Standards  $\text{Bac}_{\text{Ref}}$  konnte ein eindeutiger Effekt beobachtet werden. Zum Erreichen der niedrigsten MHK-Werte (Minimale Hemm-Konzentration) wurde die  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration bis zu einem Wert von 67,6 mg/L  $\text{ZnSO}_4$  gesenkt. Eine weitere Verringerungen der  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration auf <50 mg/L ergab erhöhte MHK Werte, woraus die direkte Bedeutung einer ausreichenden  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration für die Komplexierung des Zielmoleküls (*C<sub>55</sub>-Carrier*) abgeleitet werden konnte. Um die Authentizität des synthetischen  $\text{BacThia}_2$  zu testen, wurde dessen antibiotische Wirksamkeit mit einem kommerziell erhältlichen, gereinigten Bacitracin A ( $\text{Bac}_{\text{Ref}}$ ) Standard verglichen. Dabei wurde für beide Produkte ein MHK-Wert von 4 µg/mL (siehe Tab. 5.5) festgestellt. Die antibiotische Einheitlichkeit des synthetischen Bacitracin A mit dem fermentativ erzeugten Bacitracin A Standard untermauert die Präzision der chemoenzymatischen Synthese.

**Tabelle 5.5: Die ermittelten MHK-Werte ( $\text{MIC}_{90}$ ) der zyklischen Bacitracin-Derivate gegen den Indikatorstamm *Bacillus subtilis* PY 79**

Verbindung	MHK-Wert (µg/mL) ( $\text{ZnSO}_4$ -Konzentration = 67,6 mg/L)
$\text{BacA}_{\text{Ref}}$	4
$\text{BacThia}_2$	4
$\text{BacThaz}_2$	12
$\text{BacOxS}_2$	40
$\text{BacOxT}_2$	12
$\text{BacAla}_2$	>800



Für die Untersuchung, ob die Substitution des heteroaromatischen Ringes einen Einfluss auf die Bioaktivität des Bacitracins hat, wurden von allen zyklischen Bacitracin-Derivaten MHK-Werte gegen *Bacillus subtilis* PY 79 bestimmt. Bemerkenswerterweise wurde für das zyklische Bacitracin-Derivat, welches einen oxidierten Thiazol-Ring (BacThaz<sub>2</sub>) enthält, mit 12 µg/mL ein dreifach erhöhter MHK-Wert verglichen mit authentischem Bacitracin A erhalten. Dies zeigt eindrucksvoll, dass der Thiazol-Ring im Molekül gleichsam in der Lage ist, das zweiwertige Zink zu binden und mit dem Zielmolekül zu interagieren. Bei den Bioaktivitätsuntersuchungen der Substrate mit sauerstoffhaltigen Heterozyklen BacOxS<sub>2</sub> und BacOxT<sub>2</sub> zeigte sich, dass mit einem MHK von 40 µg/mL das Derivat BacOxS<sub>2</sub> eine deutlich schwächere antibiotische Wirksamkeit verglichen mit dem natürlichen Produkt Bacitracin A besitzt. Erstaunlicherweise konnte für das Methyloxazol-Derivat ein MHK-Wert von 12 µg/mL ermittelt werden.

Die Bedeutung des Heterozyklus für die Bioaktivität des Moleküls konnte durch das zyklische Bacitracin-Derivat BacAla<sub>2</sub> eindeutig nachgewiesen werden. So liegt der MHK-Wert dieses zyklischen Produktes mit mehr als 800 µg/mL deutlich über den MHK-Werten heterozyklustragender Bacitracin-Derivate und lässt den eindeutigen Schluss zu, dass der Heterozyklus im Bacitracin Molekül den wesentlichen Teil des molekularen Pharmakophors darstellt.

## 5.2 Die chemoenzymatische Surfactin Produktion

### 5.2.1 Die Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters

Alle bis heute charakterisierten TE-Domänen zeigen nicht nur die gewünschte Zyklisierungsreaktion bei der *in vitro* Umsetzung von linearen Peptid-Thioester-Substraten, sondern katalysieren auch den ungewünschten Angriff des Nukleophils Wasser auf die Acyl-O-TE Oxoesterbindung. Das daraus resultierende Nebenprodukt, die freie Peptidsäure, stellt eine nicht zu unterschätzende Limitierung der chemoenzymatischen Makrozyklisierung dar. In einigen Fällen ist das Verhältnis des zyklischen Produktes zur Hydrolyse sogar auf die Seite der freien Peptidsäure verschoben, wie die chemoenzymatische Zyklisierungsreaktion der Surfactin TE eindeutig belegt (siehe Tab. 5.2.1). Mit einem Anteil von fast 65% der Produktausbeute trägt die Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters wesentlich zur Produktminimierung der Reaktion bei. Um die Hydrolyse der Reaktion zu unterdrücken und damit die Ausbeute der gewünschten zyklischen Verbindungen zu steigern, wurden in den letzten Jahren vermehrte Anstrengungen unternommen. Durch den Einsatz nichtionischer Detergenzien, wie zum Beispiel Brij 58, konnte eine 150-fachen Steigerung der zyklischen Produktausbeute im Falle der Tyrocidin-TE erzielt werden.<sup>[132]</sup> Eine Alternative zu diesen Untersuchungen stellt die Verwendung nichtwässriger Medien, wie organischen Lösungsmitteln, superkritischen Gases und ionischen Flüssigkeiten dar. Diese haben sich in den letzten Jahren als effektive Alternativen enzymkatalysierter Reaktionen, in denen die Unlöslichkeit der Substrate in Wasser oder die Bildung von limitierenden Nebenprodukten durch das wässrige Milieu zu Produktminimierungen führt, erwiesen.<sup>[108, 111, 114]</sup> Um diese alternativen Solventien für die chemoenzymatische Zyklisierungsreaktion zugänglich zu machen, wurde in dieser Arbeit die Aktivität der Srf-TE und anderer Zyklasen in organischen Lösungsmitteln, wie auch in ionischen Flüssigkeiten untersucht.

Die Zyklisierungsreaktion der Surfactin-Zyklase (Srf-TE) in wässrigem Medium wurde bereits in früheren Studien eingehend untersucht.<sup>[54]</sup> Hierbei konnte gezeigt werden, dass die freistehende Surfactin-Zyklase ihre Zyklisierungsaktivität *in vitro* behält, wenn man sie mit löslichen, heptapeptidischen Thioester-Substraten inkubiert. Für die Erhöhung der Löslichkeit wurde im Rückgrat der linearen Thioester-Substrate die

Position 3 (D-Leu) durch eine D-Diaminopropionsäure ersetzt, und zusätzlich die authentische N-terminale C<sub>14</sub>-Fettsäure durch eine kürzere  $\beta$ -Hydroxybuttersäure substituiert (SLP<sub>3</sub>-SNAC). Eine chemoenzymatische Synthese des authentischen Surfactins war durch die Unlöslichkeit des Peptidyl-Thioester Substrates in Wasser, unter den gewählten Bedingungen nicht durchführbar.

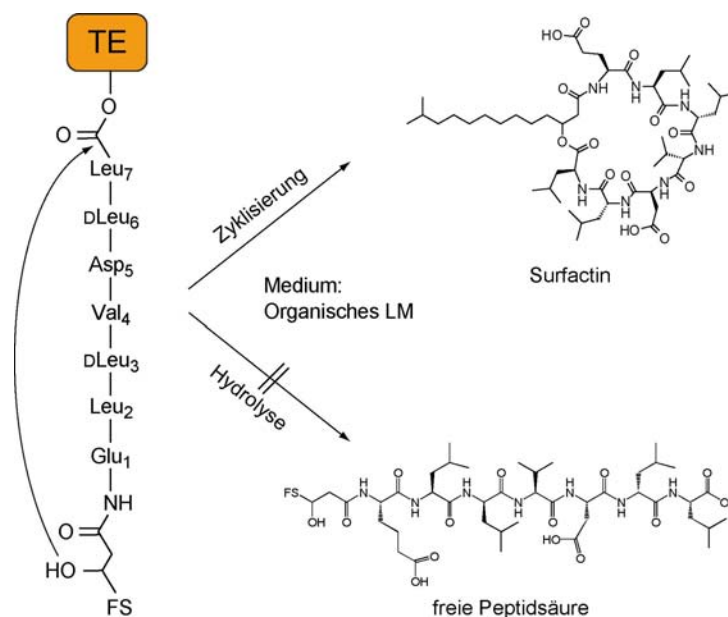
**Tabelle 5.2.1: Das Verhältnis der Zyklisierung zur Hydrolyse am Beispiel einiger NRPS-Zyklasen im wässrigem Milieu**

NRPS Thioesterase	Verhältnis Zyklisierung/ Hydrolyse
Bacitracin TE	3,8
Fengycin TE	4,3
Surfactin TE	0,5
Tyrocidin TE	1,2
Gramicidin TE	4,0
Daptomycin TE	10,0
CDA TE	5,0
A 54145 TE	12,0
Pristinamycin TE	2,0
Mycosubtilin TE	0,9
Syringomycin TE	0,7

### 5.2.2 Die Aktivität der NRPS-Zyklasen in organischen Lösungsmitteln

Seit den Untersuchungen von A. Klibanow, der die Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln etablierte, sind viele Untersuchungen zur Enzymkatalyse in nichtwässrigen Solventien publiziert worden.<sup>[109]</sup> Für erfolgreiche Aktivitätsassays verschiedener Zyklasen in organischen Lösungsmitteln mussten diese Enzyme lyophilisiert werden. In den ersten Versuchen wurden 50  $\mu$ L, der in Assay-Puffer gelösten Zyklase, über Nacht lyophilisiert und anschließend in verschiedenen organischen Lösungsmitteln aufgenommen. Die Produktbildung der Inkubation dieser Zyklasen mit ihren synthetischen linearen Peptidyl-Thioester-Substraten für 6 h bei 37°C wurde mittels HPLC-MS untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Zyklisierungsreaktion in Methanol (MeOH) nur bei der Surfactin-, Fengycin-,

Syringomycin- und CDA- Zyklase nachgewiesen werden konnte (siehe Tab. 5.2.2). Da MeOH als alternatives Nukleophil auch die Acyl-O-TE Oxoesterbindung angreifen kann, kommt es als Konkurrenz-Reaktion zur Bildung von Methylestern. Durch diese Nebenreaktion könnte dieses Lösungsmittel nur bei speziellen Anwendungen, wie der gewünschten Bildung des Methylesters im Falle der Aspartam-Bildung, von Vorteil sein. Ein quantitativer Ausschluss der Nebenproduktbildung konnte nur im Falle der Zyklisierungsreaktion der Srf-TE in N,N-Dimethylformamid (DMF) beobachtet werden (siehe Abb. 5.2.1). Alle weiteren organischen Lösungsmittel führten unter diesen Bedingungen zu keiner detektierbaren Aktivierung der Zyklastasen.



**Abb. 5.2.1: Die chemoenzymatische Zyklisierung in organischen Lösungsmitteln:** Das Srf-TE gebundene Peptid kann durch zwei Mechanismen vom Enzym freigesetzt werden. Entweder das interne Nukleophil der  $\beta$ -OH-Fettsäure spaltet den Ester unter Freisetzung des cyclischen Produktes Surfactin, oder  $H_2O$  führt zu dessen Hydrolyse und bewirkt die Freisetzung der freien Peptidsäure. In organischen Lösungsmitteln sollte diese Konkurrenz-Reaktion der Hydrolyse durch den Ausschluss von Wasser nicht mehr möglich sein und das cyclische Produkt quantitativ hergestellt werden. FS = Fettsäure.

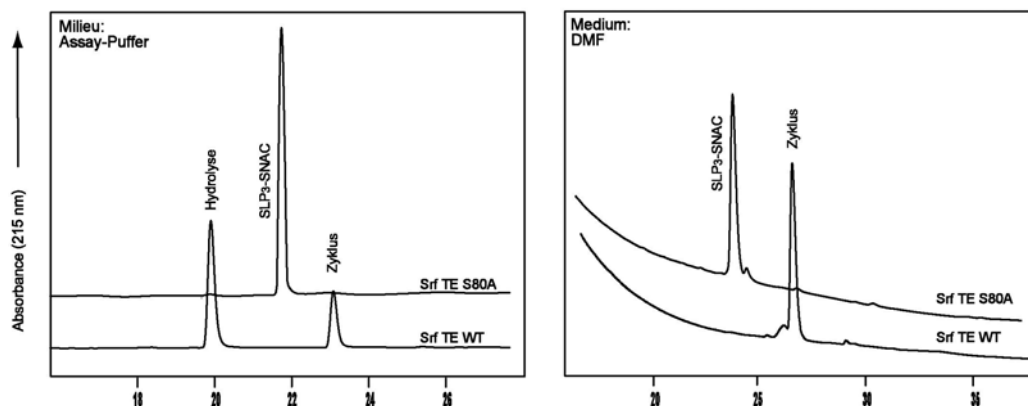
Tabelle 5.2.1: Die Zyklisierungsreaktion in verschiedenen organischen Lösungsmitteln

LM	SrfTE	TycTE	FenTE	MycTTE	SyrTTE	CDAlITE	SnbTE	BacTTE
H <sub>2</sub> O	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv
MeOH	aktiv	n.a.	aktiv	n.a.	aktiv	aktiv	n.a.	n.a.
<i>i</i> -Prop	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MeCN	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
THF	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Toluol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
EtAc	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n-Hexan	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NMP	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DMF	aktiv	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DMSO	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DCM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = nicht aktiv

### 5.2.2.1 Die Zyklisierungsreaktion der Srf-TE in DMF

Die ersten Experimente zur Zyklisierungsreaktion der Srf-TE in DMF wurden mit dem wasserlöslichen Substrat SLP<sub>3</sub>-SNAC durchgeführt. Die enzymatische Makrolaktonisierung wurde sowohl in wässrigem Puffer als auch in DMF untersucht und verglichen (siehe Abb. 5.2.2). Um einen Einfluss der Lyophilisation auf die Zyklisierungsreaktion auszuschliessen und die Vergleichbarkeit der beiden Reaktionen zu sichern, wurden beide Zyklisierungsreaktionen mit frisch lyophilisierten Enzymproben durchgeführt. Während in wässrigem Puffer das dominante Produkt der Reaktion das hydrolysierte Peptid darstellte, konnte in DMF eine quantitative Umsetzung des Substrats zum gewünschten zyklischen Surfactin-Derivat innerhalb von 2 h beobachtet werden. Der Nachweis, dass es sich bei der Zyklisierungsreaktion in DMF um eine enzymabhängige Reaktion handelt, konnte mit Hilfe der Srf-TE(S80A)-Mutante erbracht werden, die im aktiven Zentrum der Zyklase anstelle des katalytischen Serin-Restes einen Alanin-Rest trägt und keine Ausbildung des Acyl-O-TE Intermediates zulässt. Das Reaktionsprofil dieser Mutante mit dem Substrat SLP<sub>3</sub>-SNAC in DMF für 2 h führte folglich auch zu keiner detektierbaren Produktbildung (siehe Abb. 5.2.2).



**Abb. 5.2.2: Reaktionsprofile der Srf-TE in Assay-Puffer und in DMF.** Im ersten Diagramm ist die Zyklisierungsreaktion der Inkubation von 2,5  $\mu\text{M}$  lyophilisierter Srf-TE in wässrigem Puffer und 300  $\mu\text{M}$  des SLP<sub>3</sub>-SNAC Substrates bei 37°C gegen die Inkubation der Mutante Srf-TE(S80A) mit dem Substrat als Negativkontrolle dargestellt. Im zweiten Diagramm ist deutlich die quantitative Produktausbeute der gleichen Reaktion nach Substitution des Reaktions-Medium durch DMF dargestellt. Alle Reaktionen wurden nach 2 h mit TFA-Lösung (4%, v/v) gestoppt. Das Reaktionsvolumen betrug 50  $\mu\text{L}$ . Die Verschiebung der Produkt-Retentionszeiten ist auf eine Optimierung des Gradienten zurückzuführen.

Die Identität der auftretenden zyklischen Produkte wurde mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse (FT-ICR-MS) bestätigt (siehe Tab. 5.2.2).

**Tabelle 5.2.2: Massenspektrometrische Charakterisierung der linearen Surfactin-Substrate und deren zyklischer Produkte.**

Verbindung	Lineare Substrate (Da)			Zyklische Produkte (Da)		
	Spezies	Berechnet	Gefunden	Spezies	Berechnet	Gefunden
SLP-SNAC	$([M+H]^+)$	1001,5515	1001,5522	$([M+H]^+)$	882,5110	882,5119
SLP <sub>wt</sub> -SNAC	$([M+Na]^+)$	1163,6977	1163,6972	$([M+Na]^+)$	1044,6567	1044,6580
SLP <sub>3</sub> -SNAC	$([M+H]^+)$	974,5227	974,5224	$([M+H]^+)$	855,4749	855,4746
SLP-NH <sub>2</sub> -SNAC	$([M+H]^+)$	1000,5675	1000,5678	$([M+H]^+)$	881,5348	881,5347
SLP-NH <sub>2</sub> -Thio	$([M+H]^+)$	991,5538	991,5541	$([M+H]^+)$	881,5348	881,5391

Die Ermittlung der kinetischen Daten ergab für die Zyklisierungsreaktion der Srf-TE in DMF eine Substrataffinität ( $K_M$ ) von 0,41 mM und eine Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) von  $0,24 \text{ min}^{-1}$ . Die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) für die Bildung des Surfactin( $C_4$ )-Zyklus beträgt somit  $0,59 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  und ist 4-mal geringer als in wässrigem Puffer (siehe Tab. 5.2.3).

**Tabelle 5.2.3: Kinetische Parameter der Zyklisierungsreaktion der Srf-TE**

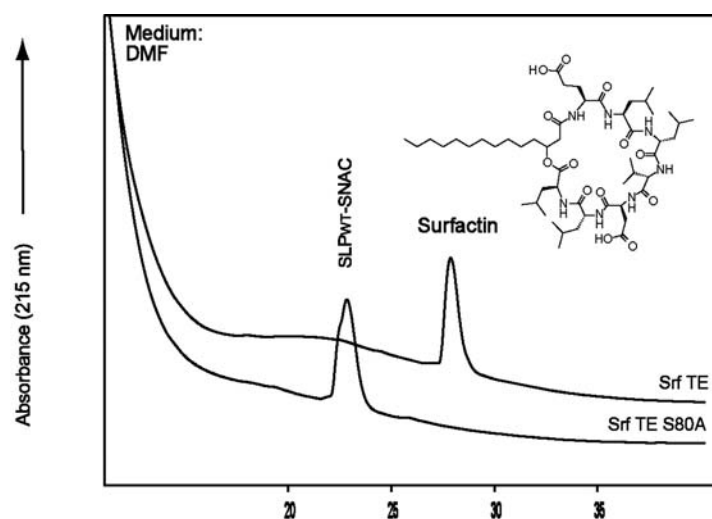
Substrat / Lösungsmittel	Srf TE			Srf TE lyophilisiert			Srf TE P <sub>26</sub> G lyophilisiert		
	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{mM min}^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{mM min}^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{mM min}^{-1}$ )
SLP <sub>3</sub> -SNAC / Puffer	n.B.		2,9	n.B.		2,56	1,02	9,11	8,93 (Hyd)
SLP <sub>3</sub> -SNAC / DMF		n.B.		0,41	0,24	0,59	0,53	0,25	0,47
SLP <sub>WT</sub> -SNAC / DMF		n.B.		0,31	0,29	0,93		n.B.	

n.B. = nicht bestimmt

### 5.2.2.2 Die chemoenzymatische Produktion von Surfactin in DMF

Da sowohl die hydrophoben Surfactin-Thioester-Substrate, als auch die Surfactin-Produkte in DMF gut löslich sind, stellt diese Löslichkeit einen weiteren Vorteil der Zyklisierungsreaktion in DMF dar. Für eine chemoenzymatische Produktion ist es obligatorisch, dass Reaktionsbedingungen geschaffen werden, die eine Löslichkeit der teilweise hydrophoben Peptid-Thioester-Substrate gewährleisten. Im Falle der chemoenzymatischen Produktion des authentischen Surfactins enthält das lineare Thioester-Substrat eine am N-Terminus des Peptides kondensierte hydrophobe  $\beta$ -OH- $C_{14}$ -Fettsäure, die zu einer stark verringerten Wasserlöslichkeit sowohl des Substrates, als auch des Produktes, führt. Da eine chemoenzymatische Zyklisierungsreaktion des verkürzten Substrates SLP<sub>3</sub>-SNAC mit Hilfe der Srf-TE in DMF möglich war, stellte sich die Frage, ob eine quantitative Produktion von authentischem Surfactin mit dieser Methode erzielt werden kann. Die Synthese des linearen Surfactin-SNAC Substrates (SLP<sub>WT</sub>-SNAC) erfolgte mittels SPPS, wobei dem linearen Peptid N-terminal eine  $\beta$ -Hydroxyl-Myristyl-Fettsäure angehängt wurde.

Dieses Substrat zeigt wie erwartet schlechte Löslichkeit in Wasser, ist allerdings in DMF gut löslich und konnte somit sehr gut für die enzymkatalysierte Zyklisierungsreaktion verwendet werden. Die Inkubation dieses SLP<sub>WT</sub>-SNAC Substrates mit der Srf-TE in DMF zeigte die quantitative Umsetzung des Substrates in authentisches Surfactin (siehe Abb. 5.2.3). Die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ) der Zyklisierungsreaktion beträgt für dieses Substrat  $0,93 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Die Erhöhung der Substrat-Affinität verglichen mit dem Substrat SLP3-SNAC ist vermutlich auf eine bessere Erkennung der langen Fettsäureketten in einer speziellen hydrophoben Bindungstasche im aktiven Zentrum der Srf-TE zurückzuführen.<sup>[63]</sup> Dadurch wird das OH-Nukleophil der  $\beta$ -Hydroxymyristinsäure besser in der aktiven Tasche positioniert und kann damit den Acyl-O-TE Oxoester effizienter angreifen.

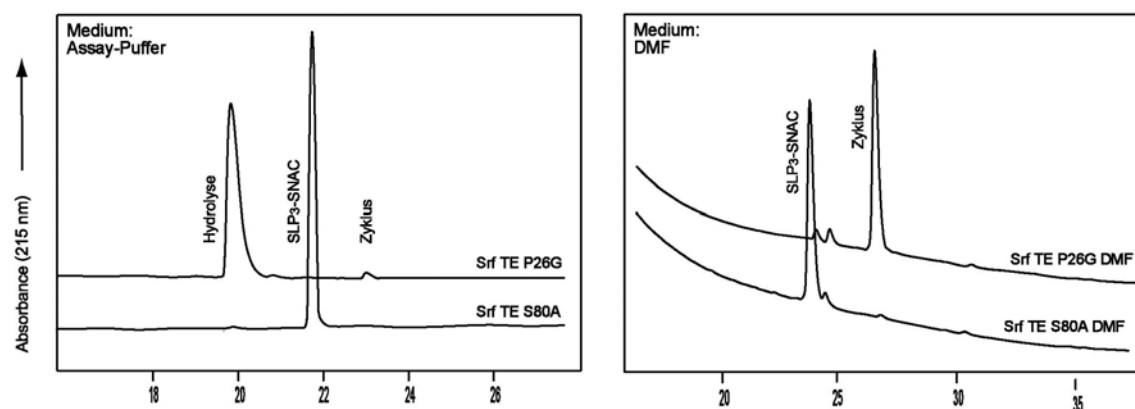


**Abb. 5.2.3: Reaktionsprofile der Srf-TE in DMF mit SLP<sub>WT</sub>-SNAC** Das Reaktionsprofil der Inkubation von Srf-TE (5  $\mu\text{M}$ ) mit dem Substrat SLP<sub>WT</sub>-SNAC (200  $\mu\text{M}$ ) bei 37°C für 2 h. Im unteren Diagramm ist die Inkubation der inaktiven S80A Mutante dargestellt, bei der kein Umsatz katalysiert werden kann. Im oberen Diagramm erkennt man die quantitative Umsetzung des Substrates zum gezeigten Surfactin.



### 5.2.2.3 Die Zyklisierungreaktion der Srf-TE(P26G)-Mutante in DMF

Nachdem die Srf-TE katalysierte Zyklisierungsreaktion in DMF charakterisiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob man bei einer Srf-TE Mutante, die in wässrigem Milieu die Zyklisierungsreaktion nicht katalysiert, die Makrozyklisierung wiederherstellen kann. Die Srf-TE(P26G)-Mutante, in der Prolin in Position 26 der Zyklase durch Glycin substituiert vorliegt, zeigt in wässrigem Milieu fast keine Zyklisierung des Substrates SLP<sub>3</sub>-SNAC (siehe Abb. 5.2.4).<sup>[54]</sup> Die Mutation wurde eingeführt um zu analysieren ob Prolin<sub>26</sub>, das direkt neben der Oxyanion-Aminosäure Valin<sub>27</sub> in der Primärsequenz zu finden ist, einen Einfluss auf die Zyklisierungsreaktion hat. Bei der Inkubation dieser Mutante in wässrigem Milieu ist im Reaktionsprofil fast nur die Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters zu beobachten. Für eine Untersuchung der Zyklisierungsreaktion wurde die Srf-TE(P26G)-Mutante ebenfalls über Nacht (10 h) lyophilisiert und in DMF aufgenommen. Anschliessend wurde sie mit dem SLP<sub>3</sub>-SNAC Substrat umgesetzt (2 h, 37°C) und das HPLC-Reaktionsprofil analysiert. Hierbei zeigt sich überraschenderweise, dass auch die Srf-TE(P26G)-Mutante in DMF in der Lage ist, die Zyklisierungsreaktion zu katalysieren (siehe Abb. 5.2.4).

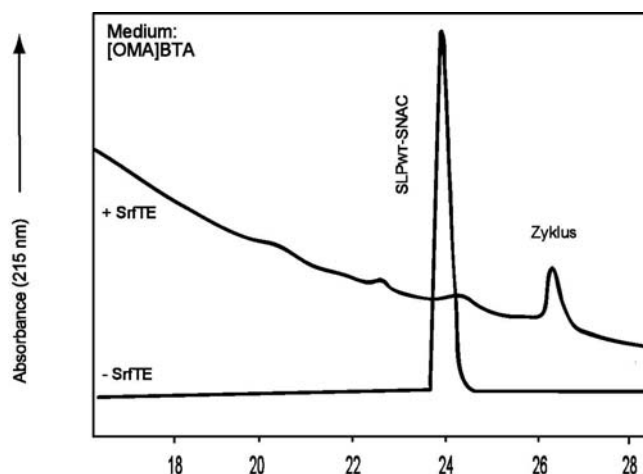


**Abb. 5.2.4: Reaktionsprofile der Srf-TE(P26G) Mutante in Assay-Puffer und DMF.** Im ersten Diagramm ist die Zyklisierungsreaktion der Inkubation von 2,5  $\mu$ M lyophilisierter Srf-TE(P<sub>26</sub>G) in wässrigem Puffer und 300  $\mu$ M des SLP<sub>3</sub>-SNAC Substrates bei 37°C dargestellt. Als Kontroll-Reaktion ist die Inkubation der Srf-TE(S<sub>80</sub>A)-Mutante mit dem Substrat dargestellt. Im zweiten Diagramm ist die gleiche Reaktion nach Substitution des Reaktions-Medium mit DMF dargestellt. Die Mutante kann die kinetisch bevorzugte Hydrolyse in wässrigem Milieu durch die Abwesenheit von H<sub>2</sub>O nicht mehr katalysieren und das Substrat wird quantitativ in das zyklische Produkt umgewandelt.

Interessanterweise ist kein wesentlicher Unterschied in der kinetischen Charakterisierung der Reaktion, verglichen mit dem Wildtyp Enzym Srf-TE in DMF, festzustellen. Die katalytische Effizienz der Reaktion beträgt  $0,47 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$  für die Zyklus-Bildung (siehe Tab. 5.2.3). Da durch den Ausschluss des Wassers in der Reaktion die Zyklisierung des Substrates die einzige Möglichkeit der Produktbildung darstellt, ist die in wässrigem Milieu kinetisch bevorzugte Hydrolyse-Reaktion in DMF nicht mehr möglich und die Mutante verhält sich ähnlich wie der Wildtyp Srf-TE.

### 5.2.3 Die Zyklisierungsreaktion der Srf-TE in ionischen Flüssigkeiten

Eine Vielzahl von Publikationen hat in den letzten Jahren den Einsatz von ionischen Flüssigkeiten (IL) in der enzymatischen Biokatalyse und deren Einfluß auf die Aktivität von Enzymen als Alternative zu konventionellen organischen Lösungsmitteln verdeutlicht.<sup>[114, 115, 136]</sup> Ionische Flüssigkeiten versprechen durch ihre fast unbegrenzten Anion- und Kationen-Kombinationsmöglichkeiten (*Designer Solvents*) die Möglichkeit einer gezielten Optimierung enzymatisch katalysierter Reaktionen. Um dieses Potential für die chemoenzymatische Zyklisierungsreaktion der Srf-TE zu nutzen, wurden verschiedene ionische Flüssigkeiten in Kooperation mit der Firma Solvent Innovation (Köln) hergestellt. Hierbei wurde durch eine breite Variation der Kation- und Anion-Kombinationen versucht, eine erste Auswahl zu treffen, in welchem IL eine Aktivierung der Zyklisierungsaktivität möglich ist. Nach erfolgter Lyophilisation der Srf-TE, wurde diese in der jeweiligen ionischen Flüssigkeit aufgenommen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit dem Substrat SLP<sub>3</sub>-SNAC inkubiert. Durch analytische Reaktionskontrolle mittels HPLC-MS konnte eine enzymkatalysierte Makrozyklisierung der Substrate nur in einer ionischen Flüssigkeit, [OMA]BTA (siehe Kapitel 2.4.2.1), beobachtet werden (siehe Abb. 5.2.5). Nach 3 h Inkubation der Srf-TE mit dem Substrat in [OMA]BTA zeigte sich, dass keine Nebenprodukte detektierbar waren. In allen anderen ionischen Flüssigkeiten konnte unter den gewählten Bedingungen keine oder nur geringe Zyklisierungsaktivität der Srf-TE beobachtet werden (siehe Tab. 5.2.4). Die Zyklisierungsreaktion der Srf-TE in [OMA]BTA führte zwar zu einer Eliminierung der Hydrolyse, allerdings machte das Ausfallen der Salze auf der Säule unter normalen Chromatographie-Bedingungen eine Bestimmung kinetischer Daten unmöglich. Um diesem Problem zu begegnen, wurde versucht, durch Extraktion der zyklischen



**Abb. 5.2.5: Reaktionsprofil der Srf-TE Zyklisierungsreaktion in [OMA]BTA.** Im oberen Diagram ist die Zyklisierungsreaktion der Inkubation von 10  $\mu\text{M}$  lyophilisierter Srf-TE in [OMA]BTA und 150  $\mu\text{M}$  des SLP<sub>3</sub>-SNAC Substrates nach 3 h bei 37°C dargestellt. Vor der Trennung auf der Säule wurde durch Ausschütteln des Reaktionsansatz (50  $\mu\text{L}$ ) mit Ethylacetat versucht, das zyklische Produkt von der ionischen Flüssigkeit abzutrennen. Im unteren Diagram ist das Reaktionsprofil des Substrates in [OMA]BTA ohne Enzym nach 3 h dargestellt. Deutlich ist die relative Abnahme der Gesamtproduktmenge gegenüber der Substratmenge zu erkennen. Diese Abnahme ist wahrscheinlich auf eine nicht quantitative Isolierung des zyklischen Produktes zurück zuführen.

**Tabelle 5.2.4:**  
**Beobachtete Aktivität der Srf-TE Zyklisierungs-**  
**Reaktion in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten.**

Ionische Flüssigkeit	Srf-TE Aktivität
[BMIM]BF <sub>4</sub>	n.a.
[BMIM]CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>	n.a.
Ecoeng <sup>TM</sup> 41M	n.a
Ecoeng <sup>TM</sup> 212	Geringe Aktivität
Ecoeng <sup>TM</sup> 1111P	n.a
[4MBP]BF <sub>4</sub>	n.a
[OMA]BTA	<b>aktiv</b>
[EoMIM]BTA	n.a
[EtOHMIM]BTA	n.a
[BMIM]BTA	n.a
[EMIM]BTA	n.a
[HMIM]BTA	Geringe Aktivität

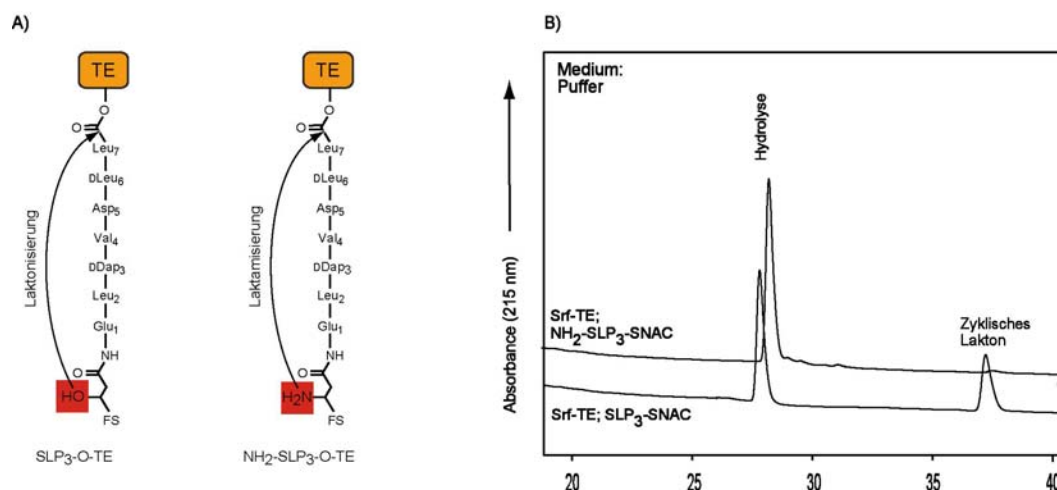
Produkte mit Ethylacetat, eine bessere Produktisolierung zu erzielen. Leider führte diese Extraktion zu einer unterschiedlichen Menge an isoliertem Produkt und keinen quantitativ reproduzierbaren Daten. Da über den molekularen Aufbau ionischer Flüssigkeiten, sowie deren physikalisch-chemische Eigenschaften, bis heute noch wenig bekannt ist, kann dieses Phänomen der unvollständigen Extraktion schwer erklärt werden. Mischungsverhältnisse der ionischen Flüssigkeiten mit 10%, 20% oder 30% Wasser führten ebenfalls zu keinen verbesserten Ergebnissen. Deshalb wurde versucht, die physikalischen Eigenschaften so zu verändern, dass unter normalen chromatographischen Bedingungen kein Aussalzen mehr zu beobachten ist. Da es sich bei [OMA]BTA um ein sehr hydrophobes IL handelt, dessen Stabilität hauptsächlich durch das Kation bestimmt wird, sollte in diesem Zusammenhang versucht werden, durch die Wahl des BTA-Anions die hydrophoben Eigenschaften des ILs beizubehalten, durch die Variation des Kations allerdings eine verbesserte Stabilität zu erzielen. Mit diesen neu synthetisierten ILs ([EoMIM]BTA, [EtOHMIM]BTA, [BMIM]BTA, [EMIM]BTA, [HMIM]BTA) wurden Aktivitätsassays hinsichtlich einer besseren Aktivität der Srf-TE und der Produktisolierung durchgeführt. Leider konnten auch diese ionischen Flüssigkeiten zur keiner Verbesserung der Produktisolierung oder der zyklischen Produktbildung beitragen.

### 5.3 Die chemoenzymatische Makrolaktam-Bildung der Srf-TE

Nichtribosomale Peptid-Zyklasen können wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben in zwei Unterklassen eingeteilt werden. Zum einen findet man Zyklasen, die eine Zyklisierung des Substrates zu einem makrolaktonischen Produkt katalysieren und zum anderen existieren Zyklasen, die das Substrat zu einem Zyklus umsetzen, der über eine Laktam-Bindung rigidifiziert ist. Bei einer chemoenzymatischen Zyklisierungsreaktion werden zwei Katalyseschritte unterschieden. Erstens die Acylierung des aktiven Serins der katalytischen Triade durch den angebotenen Peptidyl-Thioester und zweitens der intramolekulare nukleophile Angriff eines Peptid-Nukleophiles auf das Carbonyl-C-Atom des Acyl-O-TE Oxoesters. Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben, katalysiert die Zykklase (Srf-TE) des Surfactin Biosynthesystems diese Zyklisierungsreaktion durch einen intramolekularen nukleophilen Angriff der  $\beta$ -Hydroxylgruppe einer  $C_{14}$ -Fettsäure auf den Acyl-O-TE Oxoester. Die Acylierung des aktiven Serin<sub>80</sub> wird *in vitro* durch aktivierte Peptidyl-SNAC-Substrate erzielt. Interessanterweise kann die Srf-TE auch die Rückreaktion der Esterspaltung katalysieren.<sup>[54]</sup> Eine Spaltung einer Makrolaktam-Bindung ist bis heute für NRPS-Zyklasen nicht beschrieben worden. Beides spricht für die geringere Stabilität des makrozyklischen Laktams, das sich aber durch eine erhöhte Flexibilität auszeichnet. Um eine hydrolytische Ringöffnung des Makrolaktams zu verhindern, habe ich in dieser Arbeit untersucht, die Ausbildung eines zyklischen Makrolaktams durch die Srf-TE zu katalysieren.

Für diese Untersuchungen wurde ein Surfactin-SNAC Substrat synthetisiert, dessen Primärsequenz sich nur durch die Substitution des intramolekularen Nukleophiles vom bereits untersuchten SLP-SNAC-Substrat unterschied. Die  $\beta$ -OH-Buttersäure des Substrates wurde hierfür durch eine  $\beta$ -NH<sub>2</sub>-Buttersäure ersetzt (siehe Abb. 5.3.1A). Die Analyse, ob Srf-TE mit Hilfe des Substrates NH<sub>2</sub>-SLP-SNAC ein Makrolaktam ausbilden kann, wurde unter Standard-Reaktion Bedingungen (5  $\mu$ M Srf-TE, 200  $\mu$ M NH<sub>2</sub>-SLP-SNAC, RT, Assay-Puffer pH 6, Reaktionsatz 50  $\mu$ L) durchgeführt. Nach zweistündiger Inkubation der Srf-TE mit diesem Substrat konnte im HPLC-Reaktionsprofil keine zyklische Produktbildung nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.3.1B). Die Identifizierung des auftretenden Signals ergab, dass das einzige gebildete Produkt der Inkubation, die freie Peptidsäure darstellt, die durch die

Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters entsteht. Zum Nachweis, dass es sich bei dieser Produkt-Bildung um eine enzymkatalysierte Reaktion handelt, wurde eine Kontroll-Reaktion durchgeführt, in der die beschriebene Srf-TE(S80A)-Mutante mit dem Substrat  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  umgesetzt wurde. Wie erwartet, führt diese Inkubation zu keiner detektierbaren Produktbildung und beweist die enzymabhängige Hydrolyse des Substrates.



**Abb. 5.3.1: Die Substrat-Selektivität der Srf-TE.** A) Darstellung der Acyl-O-TE Intermediate der verschiedenen Surfactin-SNAC Substrate. Nach der Acylierungs-Reaktion katalysiert die Srf-TE den intramolekularen Angriff der  $\beta$ -OH-Gruppe der Peptid-Fettsäure auf das C-Carbonyl-Atom des Acyl-O-TE Oxoesters. Durch Substitution des OH-Nukleophiles mit einer Aminofunktion könnte Srf-TE eine Makrolaktamisierung katalysieren. B) Im unteren Diagramm ist das Reaktionsprofil der Inkubation von 5  $\mu\text{M}$  Srf-TE mit 200  $\mu\text{M}$  SLP-SNAC für 2 h dargestellt. Diese führt zur vollständigen Umsetzung des Substrates in zwei Produkte. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation der Srf-TE mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  ausschliesslich zur Freisetzung der Peptidsäure durch den Angriff von Wasser auf die Acyl-O-TE Oxoesterbindung (oberes Diagramm).

Da eine Zyklisierung des Substrates SLP-SNAC mittels des Enzyms Srf-TE möglich ist und das Substrat  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  nur enzymatisch hydrolysiert wird, stellt sich die Frage, worin die Ursache dieser Substrat-Diskriminierung liegt. Die enzymkatalysierte Hydrolyse des Substrates  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  beweist, dass eine Acylierung der Zyklase mit diesem Substrat erfolgt. Allerdings scheint das angebotene Substrat nicht in der Lage zu sein in einen Makrozyklus umgesetzt zu werden. Da sich beide angebotenen Substrate nur in ihrem intramolekularen Nukleophil unterscheiden, stellt sich also die Frage, warum eine Hydroxyl-Funktion zur Ausbildung eines zyklischen Produktes führt, während eine Aminofunktion als

intramolekulares Nukleophil von der Zyklastase nicht akzeptiert wird. Die Ursache dieser Substrat-Diskriminierung sollte somit in der Nukleophilie der Funktionalität oder der Positionierung des Nukleophils in der aktiven Tasche der Zyklastase begründet liegen.

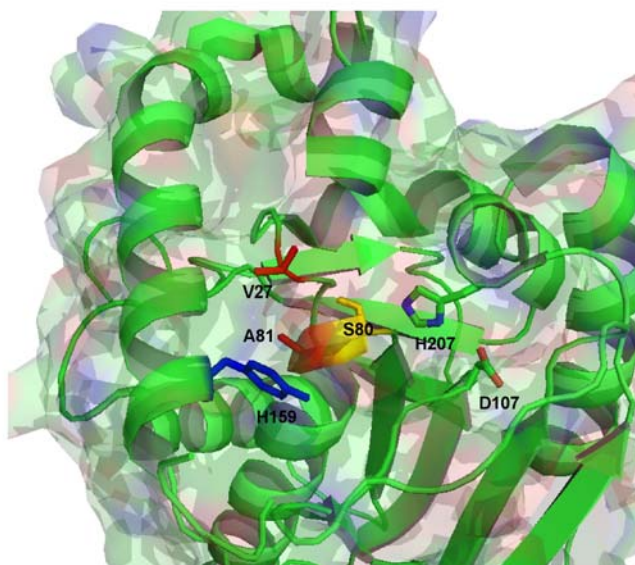
### 5.3.1. Die Nukleophilie der Surfactin-Substrate

Betrachten wir als erstes die Nukleophilie der Substrate, so ist eine geringere Nukleophilie der Aminofunktion des  $\text{NH}_2$ -SLP-SNAC Substrates gegenüber der Hydroxyl-Funktion durch den abnehmenden elektronegativen Effekt nicht zu vermuten. Allerdings sollte die Aminofunktion bei pH 6 (Assay-Puffer) protoniert vorliegen und dessen Nukleophilie ist dementsprechend niedriger. Im Falle der Srf-TE stellen die physikalisch-chemischen Eigenschaften der aktiven Tasche die Optimierung der Zyklisierungsreaktion auf das angebotene Hydroxyl-Nukleophil dar. Bei pH 6 weist eine  $\beta$ -Hydroxyl-Alkyl-Funktion einen  $\text{pK}_a$  von ungefähr 10 auf. Die  $\beta$ -Amino-Alkyl-Funktion des  $\text{NH}_2$ -SLP-SNAC-Substrates ist mit einem  $\text{pK}_a$  von über 40 deutlich weniger azid und damit wahrscheinlich nicht in der Lage, bei den in der aktiven Tasche vorhandenen physikalisch-chemischen Zuständen ein Proton zu eliminieren. Nur im Falle der Deprotonierung der Ammonium-Funktion sollte es möglich sein, die erhöhte Nukleophilie zu nutzen um eine Zyklusbildung zu katalysieren. Hierfür wurde in ersten Untersuchungen die Basizität des vorhandenen Assay-Puffers schrittweise von pH 6 auf pH 10 erhöht. Nach jeweiliger Inkubation der Srf-TE mit dem  $\text{NH}_2$ -SLP-SNAC Substrat, zeigte das Reaktionsprofil dieser pH-Scans keine zyklische Produkt-Bildung, was auf eine Beibehaltung der physikalisch-chemischen Zustände innerhalb der aktiven Tasche unabhängig der Basizität der Umgebung schließen lässt.

### 5.3.2 Rationales Protein Design der Srf-TE

Natürlich vorkommende Enzyme sind Biokatalysatoren, die auf spezielle katalytische Anforderungen hin optimiert werden können.<sup>[137]</sup> Durch die wachsende Zahl von Kristallstrukturen können heutzutage gezielt katalytisch wichtige Aminosäuren in Enzymen identifiziert werden und durch Mutagenese (*site saturated mutagenesis*) mit allen proteinogenen Aminosäuren substituiert werden. Dadurch

entsteht eine Vielzahl von Mutanten des Wild-Typ Enzyms, die gezielt darauf getestet werden können, eine gewünschte Reaktion zu katalysieren. Darüberhinaus erhält man Informationen über die Bedeutung verschiedener Seitenketten-Funktionen des Enzyms für seine katalytische Effizienz.<sup>[138]</sup> Ziel dieser Arbeit war es, in der Kristallstruktur der Srf-TE Aminosäuren zu identifizieren, die einen Aufschluss über den Reaktionsmechanismus dieser Zyklastase geben können. Die identifizierten Positionen sollten durch einen rationalen Ansatz mit anderen Aminosäuren substituiert werden, um eine Zyklierungsreaktion des oben beschriebenen Substrates  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  zu induzieren.

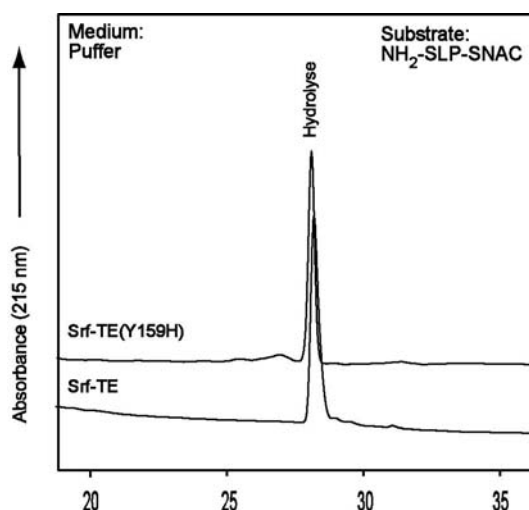


**Abb. 5.3.2: Katalytisch wichtige Aminosäuren der Srf-TE:** Ausschnitt aus der Kristallstruktur der Srf-TE (1JMK). Gezeigt ist die aktive Tasche mit ihren katalytisch wichtigen Aminosäure-Resten. Zu erkennen ist die katalytische Triade mit dem in gelb markierten aktiven Serin<sub>80</sub>, dem Histidin<sub>207</sub> und dem Aspartat<sub>107</sub>. In rot sind die beiden *Oxyanion Hole* ausbildenden Aminosäuren Valin<sub>27</sub> und Alanin<sub>81</sub> dargestellt. Das in blau dargestellt Tyrosin<sub>159</sub> interagiert mit der aktiven Tasche und befindet sich auf einem flexiblen Loop Bereich der TE, dem sogenannten „Lid“.



### 5.3.1.1 Die gezielte Veränderung der Basizität in der aktiven Tasche

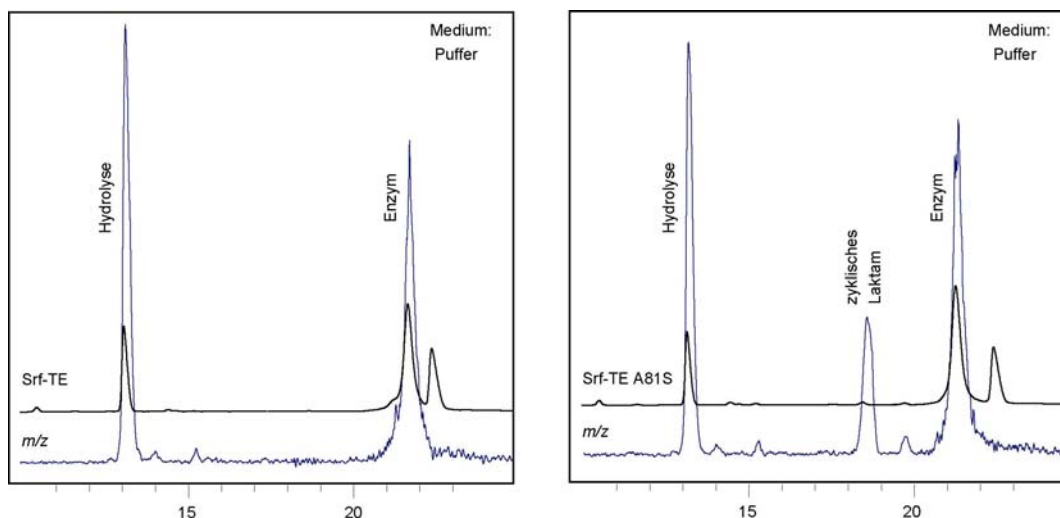
Durch gezielte Beeinflussung der Basizität in der aktiven Tasche der Zyklase sollte versucht werden, eine Deprotonierung des  $\beta$ -Amino-Substrates zu erzielen. Die Substratspezifität einer Klasse der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, den sogenannten Lipasen, wird entscheidend durch den sogenannten „Lid“-Bereich des Enzyms bestimmt.<sup>[139]</sup> Dieser Lid ist auch in der Struktur der Srf-TE zu erkennen und wurde nun dahingegen untersucht, ob dort eine Aminosäure zu finden ist, die mit der aktiven Tasche in Wechselwirkung tritt. Tatsächlich findet man in Position 159 der Srf-TE einen Tyrosin-Rest, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er sich nicht nur im flexiblen „Lid“-Bereich befindet, sondern auch mit der aktiven Tasche der TE interagiert (siehe Abb. 5.3.2). Durch eine gezielte Mutation konnte diese Position (Y159) mit einem basischen Histidin-Rest substituiert werden um einen  $pK_a$ -Shift in der aktiven Tasche zu induzieren und die Deprotonierung des Substrates zu ermöglichen. Die Identität der erhaltenen Srf-TE(Y159H)-Mutante wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Inkubation dieser Srf-TE(Y159H)-Mutante mit dem Substrat  $NH_2$ -SLP-SNAC für 3 h führte leider zu keiner detektierbaren Makrolaktam-Bildung (siehe Abb. 5.3.3). Die Integration eines zusätzlichen Histidin-Restes in die aktive Tasche der Srf-TE führt also dementsprechend nicht zu einer ausreichenden Deprotonierung und Erhöhung der Nukleophilie des  $NH_2$ -SLP-SNAC Substrates.



**Abb. 5.3.3: Das Reaktionsprofil der Srf-TE(Y159H)-Mutante:** Im oberen Diagramm ist die Inkubation von 5  $\mu$ M der Srf-TE(Y159H)-Mutante mit 200  $\mu$ M des Substrates  $NH_2$ -SLP-SNAC nach 2 h dargestellt. Im unteren Diagramm ist zu Vergleichszwecken die gleiche Reaktion des Wild-Typ Enzyms Srf-TE dargestellt. Beide Enzyme können das Substrat nur zur freien Säure durch Hydrolyse der Acyl-O-TE Oxoesterbindung umsetzen.

### 5.3.2.2 Die Seitenketten-Spezifität der Oxyanion Hole Aminosäuren

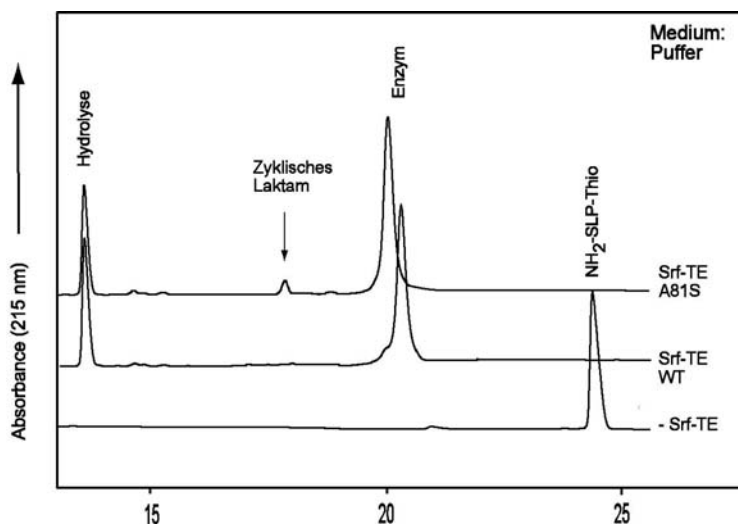
Die katalytische Effizienz eines Enzyms beruht einzig auf seiner Fähigkeit, die Aktivierungsenergie  $\Delta G^\ddagger$  einer chemischen Reaktion zu senken. Diese Fähigkeit wird dadurch erreicht, dass die Tertiärstruktur eines Enzyms den Übergangszustand der Reaktion stabilisiert. Die Energie-Bilanz der Reaktion ändert sich dabei nicht. In NRPS-Zyklasten ist die Ausbildung des intermediären tetrahedralen Übergangszustandes dadurch begünstigt, dass dieser, durch die Peptid-Bindung zweier *Oxyanion-Hole* ausbildende Aminosäuren stabilisiert wird (siehe Kap. 2.2.3.1). Durch einen Sequenzvergleich verschiedener Zyklasten konnte herausgefunden werden, dass die Aminosäuren, welche sich direkt *downstream* neben dem katalytisch aktiven Serins befinden, ein auffälliges Muster der Seitenketten-Funktionen aufweisen. Diese Aminosäure, die einen Teil des *Oxyanion-Hole* ausbildet, trägt in Zyklasten, die eine zyklische Makrolaktonisierung katalysieren eine kurze aliphatische Seitenkette. In Zyklasten, die eine Makrolaktam-Bildung katalysieren, ist in dieser Position ein konservierter Serin-Rest zu finden. Um herauszufinden, ob diese Position einen entscheidenden Einfluss auf die Substrat-Selektivität der Srf-TE hat, wurde in Position 81 (Alanin) durch gezielte Mutation ein Serin eingeführt. Die Identität der erhaltenen Srf-TE(A81S)-Mutante konnte durch eine Sequenzierung bestätigt werden. Nach erfolgter Inkubation dieser Srf-TE(A81S)-Mutante mit dem Substrat  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  für 3 h konnte im HPLC-Reaktionsprofil dieses Assays ein geringer Umsatz (0,5%) zum gewünschten Surfactin-Makrolaktam (Surfactam) detektiert werden. Der Hauptanteil der Produkt-Bildung liegt allerdings mit über 99% immer noch auf Seiten der freien Peptidsäure (siehe Abb. 5.3.4). Verglichen mit der Reaktion des Wildtyp-Enzym Srf-TE, beweist der Umsatz zum zyklischen Produkt durch die Mutante allerdings die Notwendigkeit einer zusätzlichen Hydroxyl-Funktion für die Makrolaktamisierung. Die Identität des auftretenden zyklischen Laktams wurde mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse (FT-ICR-MS) bestätigt (siehe Tab. 5.2.2).



**Abb. 5.3.4: Das HPLC-MS-Reaktionsprofil der Makrolaktam-Bildung:** Im linken Reaktionsprofil ist die Inkubation von 10  $\mu\text{M}$  Srf-TE mit 200  $\mu\text{M}$  des Substrates  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  nach 3 h dargestellt. Das obere Diagramm stellt die UV-Absorption bei 215 nm dar, in dem die quantitative Umsetzung des Substrates zur freien Säure durch die Hydrolyse zu erkennen ist. Zur Verdeutlichung ist im unteren Diagramm das MSD-Signal  $m/z$  des Laufes dargestellt. Das rechte Reaktionsprofil repräsentiert die Inkubation der Srf-TE(A81S)-Mutante mit demselben Substrat bei gleichen Reaktionsbedingungen. Deutlich ist im MSD-Diagramm hierbei die Entstehung eines neuen Signales bei einer Retentionszeit von 18,5 Minuten zu beobachten, das der Masse entspricht, die für das zyklische Laktam errechnet wurde.

Durch Synthese eines reaktiveren Substrates ( $\text{NH}_2\text{-SLP-Thio}$ ), indem die SNAC-Abgangsgruppe durch eine Thiophenol-Abgangsgruppe ersetzt wurde, konnte interessanterweise eine Steigerung des Gruppenübertragungs-Potentials der Abgangsgruppe für eine verbesserte Ausbeute des zyklischen Produkts genutzt werden. Hierfür wurde das synthetisierte Substrat  $\text{NH}_2\text{-SLP-Thio}$  ebenfalls für 3 h mit der Srf-TE(A81S)-Mutante umgesetzt. Das Reaktionsprofil (siehe Abb. 5.3.5) dieser Inkubation zeigte eine erhöhte Surfactam-Bildung (11%). Die Identität des zyklischen Produkts wurde mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse (FT-ICR-MS) auch in diesem Fall eindeutig bestätigt (siehe Tab. 5.2.2). Um auszuschliessen, dass es sich bei der Zyklus-Bildung um eine enzymunabhängige Reaktion handelt, wurde auch dieses Substrat für 3 h bei RT ohne Enzym inkubiert. In diesem Reaktionsprofil ist keine Produkt-Bildung zu erkennen. Auch die Inkubation des Wildtyp-Enzyms Srf-TE mit dem Substrat  $\text{NH}_2\text{-SLP-Thio}$  zeigte keine zyklische Laktam-Bildung, was wiederum eindeutig die Notwendigkeit der OH-Seitenketten-Funktion der Position 81 für die Surfactam-Bildung herausstellt. Da beide Substrate,  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  und  $\text{NH}_2\text{-SLP-Thio}$ , gleichfalls in der Lage sind das Serin<sub>80</sub> in der aktiven Tasche zu

acylieren und die erhöhte Reaktivität der Abgangsgruppe keinen Einfluss auf die Zyklisierungsreaktion haben sollte, wird dieser Sachverhalt ausführlicher in Kapitel 6.3 diskutiert.



**Abb. 5.3.4: Das HPLC-Reaktionsprofil der Makrolaktam-Bildung mit dem Substrat NH<sub>2</sub>-SLP-Thio:** Im obersten Diagramm ist die Inkubation der Srf-TE(A81S)-Mutante (10  $\mu$ M) mit 200  $\mu$ M des Substrates dargestellt. Deutlich ist eine Makrolaktam-Bildung zu erkennen. Als Kontroll-Reaktion ist im mittleren Diagramm die Inkubation des Wild-Typ Enzyms Srf-TE unter den gleichen Reaktionsbedingungen gezeigt. Im untersten Diagramm ist das Substrat nach 3 h Inkubation ohne Enzym abgebildet.

Eine weitere interessante Fragestellung war, ob es durch die Integration einer Hydroxyl-Funktion in der zweiten Oxyanion-Aminosäure Valin (Position 27) der Srf-TE ebenfalls zu einer gewünschten zyklischen Laktam-Bildung kommen kann. Um die Nähe der OH-Funktionalität innerhalb der aktiven Tasche zum Carbonyl-C-Atom des Acyl-O-TE Oxoesters zu sichern und um zu erfahren, ob eine zusätzliche Wasserstoff-Brücke die Nukleophilie des Substrat-Nukleophils erhöhen kann, war diese zweite *Oxyanion-Hole* Position sehr vielversprechend. Durch gezielte Mutation wurde die Position Valin<sub>27</sub> innerhalb der Srf-TE durch ein Threonin substituiert und die Identität der Mutante durch Sequenzierung sichergestellt. Die Inkubation dieser Mutante Srf-TE(V27T) mit den beschriebenen Substraten NH<sub>2</sub>-SLP-SNAC und NH<sub>2</sub>-SLP-Thio führte zu keiner detektierbaren makrozyklischen Laktam-Bildung. Da die OH-Funktion in Position 81 einen entscheidenden Einfluss auf die Laktam-Bildung hat, wurde anschliessend versucht eine „Doppel-Mutante“ Srf-TE(V27T/A81S) herzustellen, in der zwei Wasserstoff-Brücken bildende OH-Funktionen in die aktive

Tasche eingebracht wurden. Ziel war es hierbei herauszufinden, ob die zyklische Laktamausbeute durch Intergration zweier Wasserstoff-Brücken Donoren erzielt werden kann. Interessanterweise konnte im Reaktionsprofil der Inkubation mit den beschriebenen Substraten wiederum eine zyklische Laktam-Bildung identifiziert werden, allerdings ohne signifikante Steigerung der Produkt-Ausbeute. Dies belegt, dass die Mutation in Position 81 den entscheidenden Einfluss auf die Laktam-Bildung hat, während eine zusätzliche OH-Funktion in der zweiten Oxyanion-Aminosäure in Position 27 keine oder nur einen geringen Einfluss auf die Makrolaktamisierung hat.

### 5.3.3 Die chemoenzymatische Surfactam Produktion in DMF

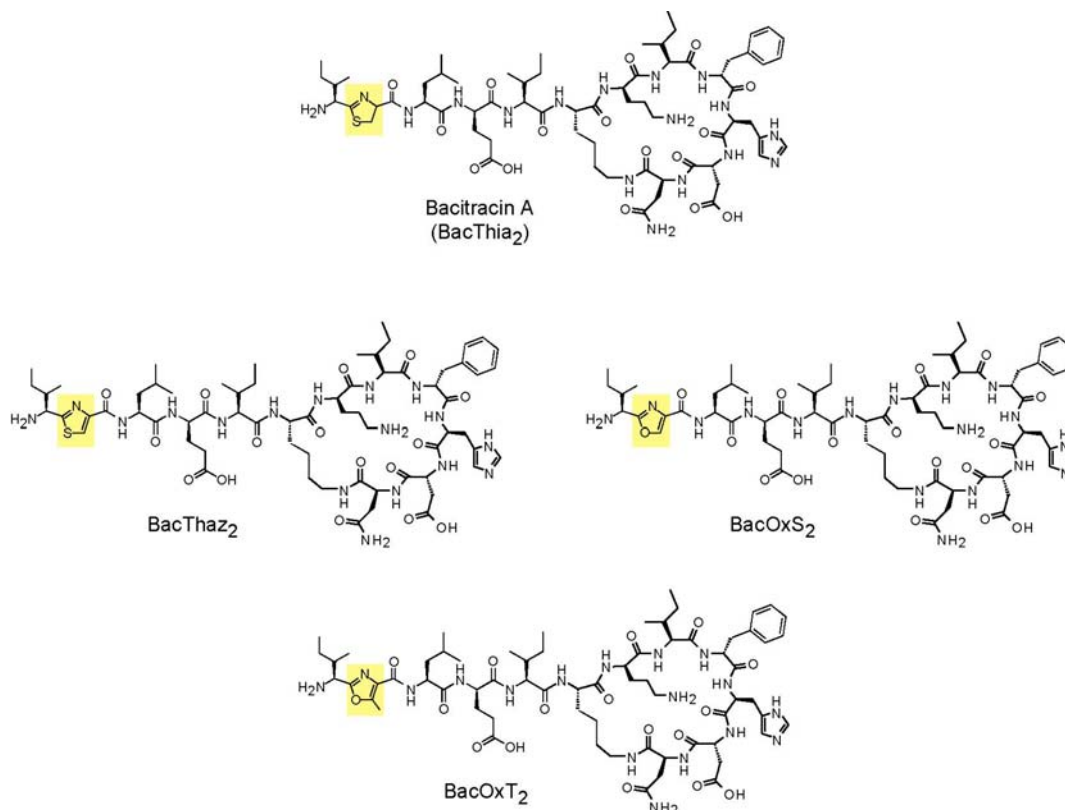
Um die Produktausbeuten der zyklischen Laktambildung mittels der Srf-TE(A81S)-Mutante zu erhöhen, wurde versucht, den in Kapitel 5.2.2.1 beschriebenen Ansatz der Zyklisierungsreaktion in DMF auf die Surfactam-Bildung anzuwenden. Wiederum konnte nach erfolgter Lyophilisation der Srf-TE(A81S)-Mutante und anschließender Aktivierung in DMF eine erhöhte Zyklisierungsrate der Reaktion beobachtet werden. Das Reaktionsprofil der erfolgreichen Umsetzung des Substrates  $\text{NH}_2\text{-SLP-Thio}$  in DMF durch die Srf-TE(A81S)-Mutante zeigt, dass eine Steigerung der zyklischen Produktausbeute bei RT auf 15% erzielt werden kann. Da in DMF keine Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters möglich ist, war es erstaunlich, dass in diesem Fall keine quantitative Produktbildung erzielt werden konnte. Da in organischen Lösungsmitteln Enzyme als thermostabiler beschrieben worden sind,<sup>[140]</sup> war eine Erhöhung der Inkubationstemperatur eine interessante Variante die Reaktivität zu steigern. Bei einem Temperaturoptimum von 50°C lag die zyklische Produktausbeute des eingesetzten Substrates nach 3 h deutlich über den bei RT erzielten Produktausbeuten. Eine weitere Erhöhung der Inkubationstemperatur in DMF führte lediglich zu einer verstärkten enzymunabhängigen Zyklisierungsreaktion, steigerte aber nicht die zyklische Surfactam-Bildung.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Derivatisierung des Bacitracins

In der Natur katalysiert die C-terminale Zyklase (Bac-TE) des Bacitracin Biosynthesystems die Zyklisierung des PCP-gebundenen Dodecapeptides zum verzweigt-kettigen Makrolaktam Bacitracin. Damit es zu diesem stereo- und regioselektiven Ringschluss kommen kann, bedarf es der spezifischen Erkennung, Acylierung und Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche der Zyklase. Dadurch wird die molekulare Grundlage geschaffen, die den nukleophilen Angriff der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins<sub>6</sub> auf den ausgebildeten Acyl-O-TE Oxoester ermöglicht. Frühere Untersuchungen mit anderen NRPS-Zyklasen haben gezeigt, dass Zyklenen aus ihrem natürlichen Verbund herausgelöst werden können und ihre Aktivität *in vitro* behalten, wenn sie mit synthetischen Peptidyl-Thioester-Substraten inkubiert werden.<sup>[57, 96]</sup> Diese chemoenzymatische Zyklisierung war die Basis der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen. Mit dieser Methode ist es möglich, lineare Peptidyl-Substrate in ihre bioaktive, zyklische Struktur zu überführen. Durch die Variabilität der durch Festphasensynthese hergestellten Substrate, stellt sie ausserdem eine schnelle und effektive Methode zur Herstellung zyklischer Derivate der Naturstoffe dar.<sup>[94]</sup> Ziel meiner Arbeit war es herauszufinden, ob die chemoenzymatische Strategie auch auf die freistehende Zyklase des Bacitracin Biosynthesystems angewendet werden kann, und ob diese in der Lage ist, synthetische Substrat-Analoga umzusetzen, woraus ein Aufschluss über das Zyklisierungsverhalten dieser Zyklase erlangt würde. Zusätzlich sollte durch Substitution des heterozyklischen Thiazolin-Ringes mit anderen fünfgliedrigen Heteroaromaten eine kleine Substanzbibliothek erstellt werden, deren Produkte sich durch gleichbleibendes Bioaktivitätsprofil, aber unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften im Vergleich zu Bacitracin A auszeichnen. Die integrierten heteroaromatischen Dipeptid-Bausteine, die entweder eine Thiazolin-, Thiazol-, Oxazol- oder Methyloxazol-Gruppe enthielten, wurden organisch-präparativ hergestellt und N-terminal an die lineare Decapeptidsequenz des Bacitracin gekuppelt. Nach erfolgreicher Thiophenol-Aktivierung konnten diese Hybridsubstrate von der Bacitracin-Zyklase erkannt und zu den gewünschten zyklischen Produkten

umgesetzt werden (siehe Abb. 6.1). Die so erhaltenen Bacitracin-Derivate wurden anschließend in einem Bioaktivitätstest auf ihr antibiotisches Potential gegen einen repräsentativen Gram-positiven Indikatorstamm getestet.



**Abb. 6.1: Die chemoenzymatisch erzeugten Bacitracin-Derivate:** Bacitracin A (BacThia<sub>2</sub>) enthält den natürlichen Thiazolin-Ring an Position 2 des Moleküls. Die erzeugten Bacitracin-Derivate zeichnen sich dadurch aus, dass an dieser Stelle ein Austausch gegen eine Thiazol-(BacThaz<sub>2</sub>), Oxazol-(BacOxS<sub>2</sub>), oder Methyloxazol-Gruppe (BacOxT<sub>2</sub>) erfolgt.

### 6.1.1 Der Einfluss des Heterozyklus auf die Zyklisierungsreaktion

Die Bacitracin-Zyklase erwies sich als effizientes molekulares Werkzeug für die Zyklisierung von Bacitracin-Thiophenol-Substraten und konnte zur chemoenzymatischen Produktion des natürlichen Bacitracins A genutzt werden. Zusätzlich gelang mit dieser Methode auch die Derivatisierung des Bacitracins durch Substitution des Thiazolin-Ringes mit einem natürlich vorkommenden heteroaromatischen Thiazol, Oxazol oder Methyloxazol. Die dabei charakterisierte

Zyklisierungsreaktion der Substrat-Derivate führte zu der Erkenntnis, dass der Heterozyklus in Position 2 des Moleküls keinen entscheidenden Einfluss auf die katalytische Effizienz der Zyklisierungsreaktion hat. Dieses ist nicht überraschend, da sich der heterozyklische Teil des Moleküls vier Aminosäuren vom Substrat-Nukleophil entfernt befindet, und somit in einem Teil des Moleküls lokalisiert ist, der keinen direkten Einfluss auf die Effizienz der Zyklusbildung haben sollte. Wie bei anderen Zyklisierungsreaktionen beobachtet werden konnte,<sup>[54, 57]</sup> ist auch im Fall der Bacitracin-Zyklase hauptsächlich die Identität und Stereochemie der zu verbindenden Aminosäuren L-Lys<sub>6</sub> und L-Asn<sub>12</sub> für eine effiziente Zyklusbildung verantwortlich. Gleichwohl hat der N-terminale Teil des Moleküls aber einen Einfluss auf die Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche. Die vollständige Entfernung des gesamten N-terminalen Teiles des Moleküls, also der Aminosäuren die nicht in den Zyklus eingebunden werden, führte zu einer völligen Aufhebung der Zyklisierung des angebotenen Substrates (BLP-7A<sub>7</sub>) und verdeutlicht, dass dieser Teil des Moleküls von essentieller Bedeutung für die Substrat-Erkennung ist. Um dieses noch weiter einzuschränken, kann man argumentieren, dass sogar die Identität des Heterozyklus eine Bedeutung für die Substrat-Positionierung besitzt. Durch die Präsenz zweier benachbarter Nukleophile im linearen Bacitracin konnte in allen Zyklisierungsreaktionen die Ausbildung zweier regioisomerer Produkte beobachtet werden. Die Regioselektivität der Bacitracin-Zyklase wurde durch die Substitution des natürlichen Thiazolin-Ringes gestört. Dabei konnte herausgefunden werden, dass schon die Oxidation des Thiazolin-Ringes zum Thiazol eine 20% höhere Nebenproduktbildung in der Zyklisierungsreaktion, verglichen mit dem natürlichen Substrat, hervorrief. Der Austausch des Schwefel- durch ein Sauerstoff-Atom im Heterozyklus führte sogar zu einer noch deutlicheren, 11-fachen, Steigerung des regioisomeren Nebenproduktes. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass eine Veränderung des natürlichen Heterozyklus zu einer Positionierung des Substrat-Nukleophils in der aktiven Tasche führt, die den zusätzlichen Angriff der benachbarten Ornithin-Seitenkette auf die Oxoesterbindung ermöglicht. Diese Beobachtung einer relaxierten Regioselektivität *in vitro* wurde auch in Untersuchungen der Zyklisierungsreaktion azider Lipopeptide beobachtet, in denen die Identität der N-terminalen Fettsäure einen entscheidenden Beitrag auf die Regioselektivität der Zykase hat.<sup>[134]</sup>

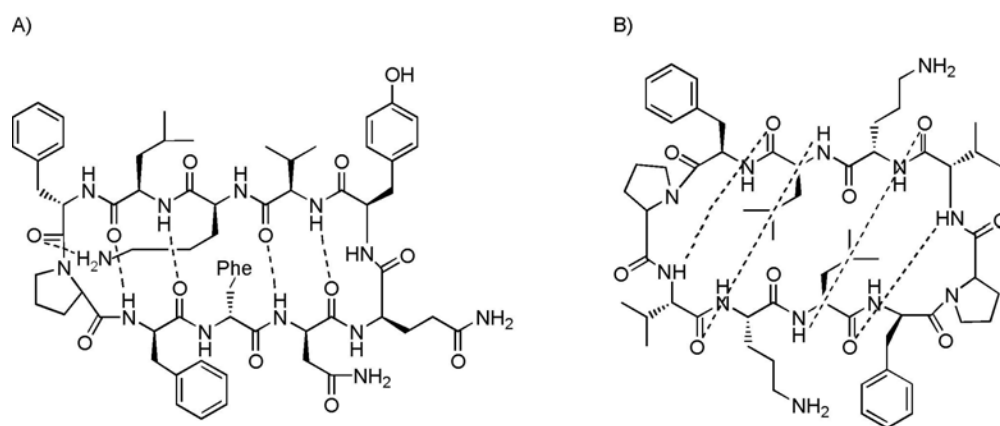


### 6.1.2 Der Einfluss des Heterozyklus auf die Bioaktivität

Der heterozyklische Thiazolin-Ring stellt einen wichtigen Teil des molekularen Pharmakophors des Bacitracins dar. Die Entfernung dieses heterozyklischen Ringes führt zu einer kompletten Aufhebung des Chelatisierungspotentials des Moleküls und somit zur Aufhebung des antibiotischen Profils. Dieser Sachverhalt konnte eindrucksvoll am Bacitracin-Derivat BacAla<sub>2</sub> verdeutlicht werden, in dem keine Bioaktivität gegenüber dem gewählten Indikatorstamm beobachtet werden kann. Bei allen anderen in dieser Arbeit durch chemoenzymatische Synthese hergestellten und untersuchten Bacitracin-Derivaten konnte hingegen eine Bioaktivität gegen den Indikatorstamm *Bacillus subtilis* PY 79 beobachtet werden. Die Substitution des heterozyklischen Pharmakophors mit anderen natürlich vorkommenden Heterozyklen führte zu der Erkenntnis, dass auch andere heterozyklische Ringsysteme in der Lage sind, dem Bacitracin-Molekül die wichtige Eigenschaft zu verleihen, zweiwertige Ionen zu komplexieren. Ausserdem scheinen die untersuchten Derivate innerhalb des gebildeten Zn<sup>2+</sup>-Komplexes die richtige Konformation anzunehmen, die eine Interaktion mit dem C<sub>55</sub>-Transporter ermöglicht. Hybrid-Antibiotika können zwar völlig neue antibiotische Wirkungsmechanismen ausbilden, wie dieses für Chimäre der nichtribosomalen Peptidantibiotika Tyrocidin und Streptogramin gezeigt werden konnte,<sup>[141]</sup> allerdings ist im Falle der untersuchten zyklischen Bacitracin-Derivate von einem ähnlichen Wirkungsprinzip wie dem des Bacitracin A auszugehen. Interessanterweise zeigte sich hierbei ausserdem, dass das Bacitracin-Derivat, welches einen Oxazol-Ring trägt, eine deutlich niedrigere Bioaktivität besitzt als das Methyloxazol-Derivat. Durch die zusätzliche Methylgruppe in Position 5 des heteroaromatischen Oxazol-Ringes sinkt der MHK-Wert auf einen 4-fach niedrigeren Wert. Diese Beobachtung ist erstaunlich, konnte allerdings auch im aziden Lipopeptid Daptomycin beobachtet werden, in dem die zusätzliche  $\beta$ -Methylgruppe des 3-Methyl-Glu<sub>12</sub> einen 6-fach niedrigeren MHK-Wert hervorrief.<sup>[142]</sup> Da keines der synthetisierten neuartigen Bacitracin-Derivate eine höhere Bioaktivität als das natürliche Bacitracin A zeigt, wäre es interessant, durch den Einbau einer zusätzlichen Methylgruppe in einen Thiazolin-Ring ein Derivat zu generieren, das die erzielten Erkenntnisse miteinander verbindet.

### 6.1.3 Der Einfluss des Substrates auf die Zyklisierungsreaktion

Eine weitere interessante Beobachtung der erwähnten Zyklisierungsreaktion kann durch die Wahl der Thiophenol-Abgangsgruppe beobachtet werden. So werden beide zyklischen Regioisomere auch in Abwesenheit der Zyklase spontan ausgebildet. Die Abnahme der Konzentration des Substrates über die Zeit ist bei dieser spontanen Zyklisierung langsamer und die Bindungsknüpfung deutlich unspezifischer in der Wahl des Substrat-Nukleophils, als bei der katalysierten Reaktion. Ein entscheidendes Merkmal der spontanen Autozyklisierung scheint dabei das Auftreten einer Vorfaltung des Peptidyl-Substrates zu sein. Diese Vorfaltung des Peptides wird durch die Möglichkeit zur Ausbildung einer sekundären  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ermöglicht und konnte ebenfalls für die nichtribosomalen Peptide Tyrocidin und Gramicidin S bewiesen werden.<sup>[133, 143]</sup> Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich aus  $4n+2$  ( $n=2$ ) Aminosäuren zusammensetzen und in der Lage sind, durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken innerhalb des Peptidrückgrates, eine antiparallele Faltungsstruktur auszubilden (siehe Abb. 6.2).



**Abb. 6.2: Die antiparallele Faltungsstruktur am Beispiel der zyklischen NRPS-Makrolaktame Tyrocidin und Gramicidin S:** A) Die Ausbildung von fünf Wasserstoff-Brücken ermöglicht die Vorfaltung des Tyrocidins. Dabei fällt auf, dass vier der Wasserstoff-Brücken durch das Rückgrat des Peptides gebildet werden. Die Aminofunktion des Ornithins kann zusätzlich eine Wasserstoff-Brücke ausbilden und ist wahrscheinlich an der Initiation der Vorfaltung beteiligt. B) Auch das Gramicidin S ist in der Lage, durch vier Wasserstoff-Brücken eine „Sekundär“-Struktur auszubilden.

Diese intrinsische Eigenschaft der Peptide erleichtert deutlich die Zyklisierung innerhalb der aktiven Tasche, führt allerdings in Lösung auch zu spontanen Autozyklisierungen.<sup>[144]</sup> Durch die Vorfaltung werden die an der Zyklisierung beteiligten Aminosäuren in unmittelbare Nähe zueinander gebracht und können nun durch die Einschränkung der Freiheitsgrade des Peptides leichter miteinander reagieren. Diese Eigenschaft einiger natürlicher Peptide spielt bei vielen Zyklisierungen eine bedeutende Rolle. So kann zum Beispiel im Biosynthesesystem des Nostocyclopeptides nach erfolgreicher Reduktion des C-Terminus eine spontane Autozyklisierung des Peptidyl-Aldehyds beobachtet werden.<sup>[145]</sup> Dieses wird wahrscheinlich entscheidend durch die Vorfaltung des Nostocyclopeptides ermöglicht. Auch für Bacitracin ist eine solche Peptidfaltung von großer struktureller Bedeutung. Wahrscheinlich wird diese durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der terminalen Aminogruppe des L-Ile<sub>1</sub> und des Carbonyl-Sauerstoff des L-Asn<sub>12</sub> ausgebildet<sup>[50]</sup> und kann zusammen mit dem hohen Gruppenübertragungspotential der Thiophenol-Abgangsgruppe die beobachtete spontane Autozyklisierung auslösen. Durch die unmittelbare Nähe des intramolekularen Nukleophils zur Carboxyl-Funktion des Peptides müsste in vorgefalteten Peptidyl-Thiophenol-Substraten also stets eine gewisse spontane Autozyklisierung unter diesen Bedingungen zu erkennen sein. Die Vorfaltung von Peptidyl-Substraten konnte bis heute hauptsächlich für Substrate zyklischer Makrolaktam-Verbindungen gezeigt werden. Die NMR-Struktur des Makrolaktams Daptomycin lässt allerdings auch auf eine Ausbildung eines Typ II  $\beta$ -Turns schließen, und legt die Bedeutung der Vorfaltung für längere Peptid-Laktone dar. Das lineare Peptidyl-Substrat des kleineren Makrolaktams Surfactin hingegen zeigt nach Aktivierung mit einer Thiophenol-Abgangsgruppe keine spontane Autozyklisierung in Lösung. Daraus lässt sich erkennen, dass lineares Surfactin wahrscheinlich nur in einem geringen Masse vorgefaltet vorliegt, bevor es in die aktive Tasche der Zyklase gelangt. Dieser Umstand lässt die Vermutung zu, dass zyklische Laktamverbindungen einer stärkeren Vorfaltung des linearen Peptides bedürfen, um effizient durch die Zyklase zyklisiert werden zu können.

## 6.2 Solvent Engineering

Verglichen mit der organischen Synthese stellt die chemoenzymatische Synthese eine einfache und schnelle Möglichkeit dar, zyklische Naturstoffe und deren Derivate zu erzeugen. Eine Hauptursache reduzierter Produktausbeuten ist dabei das generelle Auftreten von Hydrolyse als Konkurrenzreaktion zur Zyklusbildung. Diese beobachtete Hydrolyse, die in der nichtribosomalen Biosynthese zu einem erheblichen Verlust von Energieäquivalenten führen würde, wird *in vivo* wahrscheinlich durch die globulären Strukturen der Synthetasen verhindert. Liegt die terminale Zyklase, wie im Fall der chemoenzymatischen Zyklisierung von ihrer natürlichen Synthetase getrennt vor, kann Wasser vermehrt in die aktive Tasche gelangen und so zu erhöhten Hydrolyseraten führen. Besonders der Einsatz von Substrat-Analoga, die durch ihre Sequenzvarianz innerhalb der aktiven Tasche nicht richtig positioniert werden können, kann zu einer erhöhten Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters führen. Dieser Sachverhalt wurde besonders bei der chemoenzymatischen Zyklisierungsreaktion der Surfactin-Zyklase beobachtet. Die natürlich vorkommende  $\beta$ -OH-C<sub>14</sub>-Fettsäure des Substrates musste durch eine kürzere  $\beta$ -OH-Buttersäure ersetzt werden, um eine effektive Zyklisierung zu erzielen und führte dadurch zu einer unbefriedigenden Ausbeute des zyklischen Produktes. Durch Verkürzung der N-terminalen Fettsäuren werden die hydrophoben Eigenschaften des Peptides vermindert und somit ein vermehrter Wassereinstrom in die aktive Tasche der Zyklase begünstigt. Der bei diesen Untersuchungen erzielte Umsatz des eingesetzten Substrates spricht mit einem Verhältnis von 70% Hydrolyse gegen eine biotechnologische Anwendung dieser Synthese-Strategie. Eine limitierte Produktausbeute wurde auch für anderen Zyklisierungsreaktionen nichtribosomaler Peptide beobachtet.<sup>[54, 146]</sup> Um die zyklische Produktausbeute der chemoenzymatischen Zyklisierungsreaktion zu steigern, wurde in dieser Arbeit der Ansatz eines *Solvent Engineering* auf die NRPS-Zyklasen angewendet. Die Substitution des wässrigen Puffer-Milieus durch organische Lösungsmittel führte in verschiedenen Arbeiten zu einer erhöhten Thermostabilität von  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen,<sup>[140]</sup> und konnte sogar für eine Veränderung der von ihnen katalysierten Reaktion genutzt werden.<sup>[147]</sup> Auch am Beispiel der nichtribosomalen Zyklase Srf-TE konnte ich zeigen, dass der Ersatz des wässrigen Puffer-Milieus durch das organische Lösungsmittel DMF für eine enzymkatalysierte Zyklisierung, die einer konventionellen

Michaelis-Menten-Kinetik folgt, verwendet werden kann. Während in wässrigem Milieu die durch Hydrolyse hervorgerufene freie Peptidsäure das überwiegende Produkt darstellt, kann in der unnatürlichen Umgebung des DMF die Zyklase eine quantitative Umsetzung des Substrates in das zyklische Produkt katalysieren. Dabei zeigte sich, dass sich die katalytische Effizienz der Srf-TE in DMF ( $0.59 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) von der in wässrigem Milieu beobachteten Effizienz ( $2.56 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) unterschied. Die erniedrigte katalytische Effizienz liegt in einer stark erniedrigten Wechselzahl des Enzyms im unnatürlichen Medium des DMFs begründet. Die reduzierte katalytische Aktivität von Enzymen in polaren organischen Lösungsmitteln konnte auch in anderen Studien beobachtet werden.<sup>[148]</sup> Um diesem Problem zu begegnen, wurde durch verschiedene Mutagenese-Strategien versucht, die enzymatische Effizienz zu steigern. Dabei war es möglich, durch eine ungerichtete Mutagenese eine deutliche Steigerung der Aktivität des Enzyms Subtilisin E in DMF zu erzielen.<sup>[149]</sup>

Ein weiterer Vorteil der enzymatischen Katalyse in nichtwässrigen Lösungsmitteln besteht in der erhöhten Löslichkeit von hydrophoben Peptidyl-Substraten. Besonders die sehr hydrophoben Surfactin-Substrate zeigen eine höhere Löslichkeit in DMF. Durch die Aktivität der Srf-TE in DMF war es dadurch zum ersten Mal möglich, ein Surfactin-Substrat, das eine lange  $\text{C}_{14}$ -Fettsäure-Kette enthielt, mit Hilfe einer freistehenden Zyklase zu zyklisieren und dadurch authentisches Surfactin chemoenzymatisch zu erzeugen. Der Einsatz des Substrates  $\text{SLP}_{\text{WT}}$ -SNAC führt dabei zu einer verbesserten katalytischen Effizienz der Srf-TE katalysierten Zyklisierungsreaktion in DMF. Dieses ist in diesem Fall auf eine bessere Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche der Zyklase zurückzuführen. In den aufgeklärten Kristallstrukturen nichtribosomaler Zyklasen konnten hydrophobe Bereiche identifiziert werden, die eine starke Bindungsaffinität zu langen Alkylketten aufweisen und damit eine optimalere Ausrichtung des Substrates in der aktiven Tasche ermöglichen.<sup>[63, 64]</sup> Die Aktivität der Srf-TE in DMF war auch von großem Vorteil für die chemoenzymatische Surfactam-Bildung. Die Srf-TE(A81S)-Mutante behielt ebenfalls ihre Aktivität in DMF und durch die Erhöhung der Zyklisierungsrate konnte eine verbesserte zyklische Surfactam-Ausbeute erzielt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die katalytische Aktivität der Srf-TE in DMF eine Methode entwickelt werden konnte, die zu erhöhter Löslichkeit der hydrophoben Surfactin-Substrate und durch die quantitative Umsetzung des Substrates in das zyklische Produkt eine substantielle Verbesserung der

chemoenzymatischen Produktion des natürlichen Surfactins und dessen Surfactin-Derivaten darstellt.

### 6.2.1 Die Position P26 in der Srf-TE

Die Aktivität der Srf-TE in DMF kann genutzt werden, um quantitative Substratumsetzung zu zyklischen Produkten zu erzielen. In der Srf-TE(P26G)-Mutante allerdings kann der ausgebildete Acyl-O-TE Oxoester in wässrigem Milieu nicht effizient von der Zyklase zyklisiert werden, so dass hauptsächlich Hydrolyse zu beobachten ist.<sup>[54]</sup> Diese beiden Beobachtungen warfen eine zusätzliche Fragestellung auf. Kann die Zyklisierungsaktivität der Srf-TE(P26G)-Mutante in DMF rekonstituiert werden? Interessanterweise konnte eine solche Rekonstitution der Zyklisierungseigenschaften dieser Mutante in DMF erzielt werden. Die gemessene katalytische Effizienz der Srf-TE(P26G)-Mutante in DMF unterscheidet sich dabei nicht wesentlich von der des Wild-Typ-Enzyms Srf-TE. Um diesen Sachverhalt näher zu analysieren, wurden Sequenzvergleiche mit verschiedenen  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen angestellt, aus denen abgeleitet werden konnte, dass die Position des Prolins 26 in der Srf-TE zu einem spezifischen Konsensus-Motiv der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gehört (siehe Abb. 6.3). In vielen  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ist an dieser Position das von Fischer und Pleiss postulierte GX-Motiv zu finden, dass zur näheren Klassifizierung des Enzyms genutzt werden kann.<sup>[68]</sup> In diesem Motiv stellt die Position des X immer eine der beiden Aminosäuren des Enzym dar, die für die Ausbildung der Oxyanionbindungstasche zuständig ist. Meine Untersuchungen zeigen, dass dieses GX-Motiv in NRPS-Zykласen durch ein PX-Motiv ersetzt vorliegt. Die einzige Ausnahme eines Enzyms, das ein solches PX-Motiv enthält, aber nicht zu der Klasse der NRPS-Zykласen gehört, ist die  $\alpha$ -Aminosäure-Esterhydrolase aus *Acetobacter Turbidans*.<sup>[150]</sup> Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse und Synthese von  $\beta$ -Laktam Antibiotika, wobei durch kinetische Kontrolle eine maximale Acyl-Transferase-Aktivität erzeugt werden kann. Es handelt sich also auch in diesem Fall um ein Enzym, das eine Bindungsknüpfung katalysiert. Da  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, die ein PX-Motiv an dieser Stelle besitzen, eine Bindungsknüpfung katalysieren, kann man von der begründeten Annahme ausgehen, dass ein integrierte Prolin eine entscheidende Bedeutung auf die Bindungsknüpfung ausübt.

	D	R	P	P	L	F	C	F	H	P	A	G	G	L	G	W	A	Y	A	G	L	A	R	H	L	Majorität	
17	Q	E	Q	I	I	F	A	F	P	P	V	L	G	Y	G	L	M	Y	Q	N	L	S	S	R	L	Srf-TE	Lineare Zyklasten
98	G	G	K	N	L	F	C	F	P	P	I	S	G	F	G	I	Y	F	K	D	L	A	L	Q	L	Fen-TE	
99	G	G	K	N	L	F	C	F	P	P	A	A	S	M	G	I	A	Y	M	G	L	A	K	H	L	Bac-TE	
26	D	S	I	P	V	F	C	F	P	P	L	I	G	Y	G	L	V	Y	N	E	M	A	K	R	L	Itu-TE	
31	G	S	I	P	V	F	C	F	P	P	L	I	G	Y	G	L	V	Y	N	E	M	A	N	R	L	Myc-TE	
20	S	Q	R	P	L	F	L	V	H	P	L	G	G	E	V	Q	Y	V	R	D	L	A	A	A	I	Syr-TE	
22	T	A	R	N	V	F	C	F	T	P	I	G	A	Q	S	V	Y	Y	Q	K	L	A	A	E	I	Tyc-TE	
45	D	R	P	P	L	F	C	V	H	P	A	V	G	L	G	W	A	Y	A	S	L	L	P	W	L	A54-TE	
46	T	A	R	P	V	F	C	V	H	P	G	S	G	M	S	W	C	Y	S	G	L	V	R	H	L	CDA-TE	
20	S	R	A	P	L	F	C	V	H	P	A	G	G	F	G	W	V	Y	S	A	L	L	R	H	T	SnbDE-TE	
32	T	D	R	N	V	F	L	F	A	P	I	G	A	Q	G	V	F	Y	K	K	L	A	E	Q	I	Grs-TE	Iterative Zyklasten
23	D	R	A	P	I	W	L	V	P	P	G	G	G	L	S	W	A	Y	L	G	F	A	Q	H	L	Thio-TE	
19	D	K	P	P	L	F	C	V	H	P	A	G	G	L	G	W	C	Y	A	G	L	M	T	N	I	DhbF-TE	
13	N	G	P	T	L	F	C	F	H	P	A	S	G	F	A	W	Q	F	S	V	L	S	R	Y	L	EntF-TE	
102	N	A	P	I	L	L	T	R	T	P	Y	N	A	K	G	R	A	N	R	V	P	N	A	L	T	AEH	NRPS Hydrolasen
41	D	R	R	P	L	F	C	V	H	A	S	G	G	L	S	W	N	Y	E	P	L	L	R	Y	L	Bps-TE	
51	G	S	G	G	F	R	G	W	H	G	I	G	D	P	G	L	N	V	S	L	A	I	Y	P	G	Yer-TE	PKS Zyklasten
66	G	E	V	T	V	I	C	C	A	G	T	A	A	I	S	G	P	H	E	F	T	R	L	A	G	DEBS-TE	
67	G	R	A	V	L	V	G	C	T	G	T	A	A	N	G	G	P	H	E	F	L	R	L	S	T	PICS-TE	Andere
114	T	P	V	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	Y	S	G	A	S	S	L	D	V	Y	D	G	R	hAChE	
112	L	P	V	M	V	W	I	H	G	G	G	L	V	L	G	G	A	P	M	Y	D	G	V	V	L	PLE	
109	L	P	V	M	L	W	I	F	G	G	G	F	E	V	G	G	T	S	T	F	P	P	A	Q	M	CRL	
114	L	P	V	M	V	W	I	Y	G	G	A	F	V	F	G	S	S	A	S	Y	P	G	N	G	N	GCL	
72	E	K	T	I	Y	I	V	F	R	G	S	S	S	I	R	N	W	I	A	D	L	T	F	V	P	RMAH	

**Abb. 6.3: Multiples Sequenz-Alignment der PX-(GX)-Konsensus-Region in  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen:** Deutlich ist in der Klasse der NRPS Zyklasten das vorhandene PX-Motiv zu erkennen.  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, die eine Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters katalysieren, oder die anders aufgebauten PKS-Thioesterasen enthalten an dieser Stelle ein spezifisches GX-Motiv.

Abkürzungen (Biosynthesesystem) A) Lineare Zyklasten: Srf-TE (Surfactin); Fen-TE (Fengycin); Bac-TE (Bacitracin); Itu-TE (IturinA); Myc-TE (Mycosubtilin); Syr-TE (Syringomycin); Tyc-TE (Tyrocidin); A54-TE (A54145); CDA-TE (Calcium Dependent Antibiotic); SnbDE-TE (Pristinamycin) B) Iterative Zyklasten: Thio-TE (Thiocoralin); Grs-TE (GramicidinS); Dhbf-TE (Bacillibactin); EntF-TE (Enterobactin). C) AEH (*Acetobacter turbidans*  $\alpha$ -Aminosäure Esterhydrolase) D) NRPS Hydrolasen: Bps-TE (Balimycin); Yer-TE (Yersiniabactin). E) PKS-Zyklasten: DEBS-TE (Erythromycin); PICS-TE (Pikromycin). F) Andere  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen: hAChE (*Human Acetylcholine Esterase*); PLE (*Pig-liver Esterase*); CRL (*Candida rugosa* Lipase); GCL (*Geotrichum candidum* Lipase); RMAH (*Rizomucor miehei* Acylhydrolase). Die Nummerierung bezieht sich hierbei auf den Abstand zum Start-Methionin der rekombinanten Proteine.

Die meisten  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, die durch Hydrolyse eine Bindungsspaltung katalysieren, besitzen das typische GX-Motiv. Auch PKS-Thioesterasen, die zwar eine Bindungsknüpfung katalysieren, allerdings einen anderen molekularen Aufbau besitzen, enthalten dieses GX-Motiv. Worin liegt nun die molekulare Erklärung dieser unterschiedlichen Konsensus-Motive? Möglicherweise bewirkt ein flexibles Glycin, im Gegensatz zu der eher starren Aminosäure Prolin in NRPS-Zyklasten, eine Erhöhung

der konformationellen Freiheit des vorliegenden  $\alpha$ -helikalen Bereiches. Weiterhin kann auch eine partielle Abschirmung des Acyl-O-TE Oxoesters durch das vorhandene Prolin nicht ausgeschlossen werden. In der Kristallstruktur der Srf-TE liegt das erwähnte Prolin<sub>26</sub> in einem evolutionär in  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen vorhandenen Lösungsmittel-Kanal. Durch diesen kann in Hydrolasen (GX-Motiv) Wasser ungehindert auf den Acyl-O-Enzym Oxoester gelangen und damit die bevorzugte Hydrolyse erklären. Ein an dieser Stelle lokalisiertes Prolin kann dagegen diesen Lösungsmittel-Kanal „blockieren“ und damit eine partielle Abschirmung des Acyl-O-TE Oxoesters gewährleisten. Ein nukleophiler Angriff des Substrat-Nukleophils würde hierdurch kinetisch begünstigt. Da die Zyklisierung in DMF die einzig mögliche Reaktion der Zyklastase darstellt, ist eine Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters in der Srf-TE(P26G)-Mutante nicht mehr möglich und sie zeigt eine ähnliche Zyklisierungsreaktion wie das Wild-Typ-Enzym Srf-TE.

### 6.3 Das Rationale Srf-TE Design

Durch die vermehrte Anzahl an Kristallstrukturen ist man heute in der Lage, die molekularen Hintergründe der Reaktionsmechanismen verschiedenster Enzyme aufzuklären und zu verstehen. Durch gerichtete Mutagenese, die eine natürlich auftretende divergente Evolution der Enzyme nachzuahmen versucht, konnten Aminosäure-Reste identifiziert werden, die für die Substrat-Toleranz eines Enzyms verantwortlich sind.<sup>[151, 152]</sup> Durch einen Vergleich verwandter Enzyme, die unterschiedliche katalytische Aktivitäten besitzen, ist es möglich, einzelne Aminosäure-Reste in einem Enzym zu identifizieren, die für die Reaktionskatalyse essentiell sind und deren Austausch zu veränderten katalytischen Aktivitäten führen kann.<sup>[137, 153]</sup> Zum Beispiel ist es möglich, durch Veränderung zweier essentieller Aminosäuren innerhalb der aktiven Tasche der Fettsäure-Acylthioester-Thioesterase II (Hydrolase) diese in eine Acyltransferase (Ligase) zu überführen und dadurch eine völlig neue Reaktionskatalyse zu erzeugen.<sup>[154]</sup> Interessanterweise führt auch der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der L-Ala-D/L-Glu-Epimerase zur Einführung von *ortho*-Succinoylbenzoat-Synthase-Aktivität oder Muconsäure-Laktonisierungs-Enzym-Aktivität.<sup>[155]</sup>



Surfactin

Iturin A

Im Falle des Surfactins katalysiert die entsprechende Zyklase Srf-TE den intramolekularen Angriff der  $\beta$ -Hydroxyl-Funktion der Fettsäure zu einem Makrolakton, wogegen die Zyklase des Iturin A Biosynthesesystems den Angriff einer  $\beta$ -Aminofunktion auf die Acyl-O-TE Oxoesterbindung katalysiert und dadurch ein Laktam generiert. Interessanterweise weisen beide Zykласen keine grossen Sequenzunterschiede zueinander auf. Beide Zykласen gehören der Familie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen an, die in ihrer Primärsequenz eine Sequenzhomologie von über 30% besitzen, woraus sich eine evolutionäre Verwandtschaft dieser Zykласen ableiten lassen könnte. Diese Verwandtschaft legt eine interessante chemoenzymatische Möglichkeit zur Derivatisierung des Surfactin-Moleküls nahe,

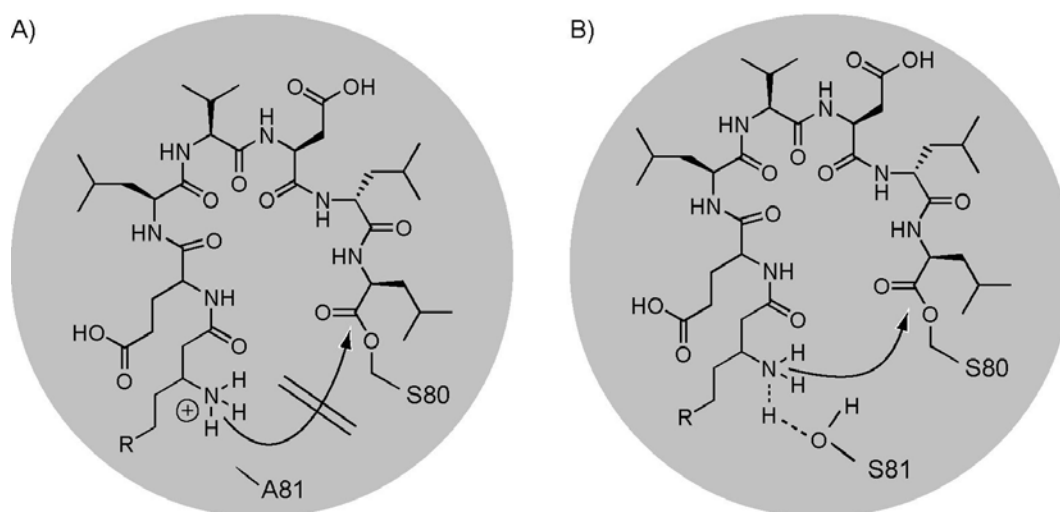
nämlich der Austausch der Makrolakton- durch eine Makrolaktam-Bindung. Durch den partiellen Doppelbindungscharakter des Laktams ist dieser weniger anfällig hydrolytisch gespalten zu werden, als das entsprechende Makrolakton.<sup>[141]</sup> Trotz der strukturellen Ähnlichkeit des Srfactins mit dem zyklischen Iturin A und der Verwandtschaft ihrer Zyklasen akzeptiert die Srf-TE ein  $\beta$ -Amino-Nukleophil innerhalb des Substrates zur Ausbildung eines zyklischen Makrolaktams nicht. Ein Substrat, in dem nur das intramolekulare Nukleophil verändert wurde, die Peptidsequenz aber wie auch die Abgangsgruppe unverändert blieben ( $\text{NH}_2$ -SLP-SNAC), konnte zwar erkannt und auf das aktive Serin übertragen werden, wurde allerdings nicht in einen Zyklus umgesetzt. Beobachtet werden konnte bei dieser Reaktion nur die Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters. Der Zyklisierungsschritt wird also durch eine kinetische Bevorzugung der Hydrolyse von der Srf-TE verhindert.

### 6.3.2 Einfluss der Basizitätsveränderung auf die Laktambildung

Ein möglicher Grund dieser verhinderten Zyklusbildung kann in der Nukleophilie des Substrat-Nukleophils liegen. Die Nukleophilie der  $\beta$ -Aminofunktion ist zwar verglichen mit der Hydroxyl-Funktion höher, diese liegt bei den gewählten Assay-Bindungen von pH 6 allerdings protoniert vor. Als geladene Ammonium-Gruppe müsste diese für einen nukleophilen Angriff auf die Oxoesterbindung deprotoniert werden, allerdings ist eine Deprotonierung der Aminogruppe durch ihren  $\text{pK}_a$  von ungefähr 10 unter diesen Bedingungen nicht möglich. Um trotzdem eine Deprotonierung des Substrates zu erzielen, wurde der pH-Wert des Assay-Puffers stufenweise bis auf pH 10 erhöht. Durch die Erhöhung der Basizität konnte keine Steigerung der Zyklisierungsselektivität der Zyklase beobachtet werden. Dieses liegt wahrscheinlich daran, dass innerhalb der aktiven Tasche der Zyklase die vorhandenen Aminosäure-Seitenketten einen definierten lokalen pH-Wert ausbilden, der die Zyklisierung des natürlichen Substrates unterstützt.<sup>[156]</sup> Eine Veränderung des pH-Wertes des umgebenen Puffer-Milieus hat in diesem Fall anscheinend keinen großen Einfluss auf den innerhalb der aktiven Tasche vorliegenden Protonierungsgrad der Aminosäure-Seitenketten. Um die Basizität innerhalb der aktiven Tasche nachhaltig zu verändern, wurde eine Mutante (Srf-TE Y159H) konstruiert, die ein basisches Histidin anstelle eines hydrophilen Tyrosins in die aktive Tasche einbrachte. Auch diese intramolekulare Veränderung der Srf-TE hatte keinen Einfluss auf die Zyklisierungsselektivität der Zyklase.

### 6.3.3 Die Position des Substrat-Nukleophils

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen eindeutig, dass trotz einer erhöhten Basizität die Srf-TE nicht in der Lage ist, das angebotene Substrat  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  zu zyklisieren. Ein weiterer möglicher Grund dieser Substrat-Diskriminierung ist durch mögliche repulsive Wechselwirkungen des protonierten Nukleophils innerhalb der aktiven Tasche zu erklären. Durch das zusätzliche Wasserstoffatom des Substrat-Nukleophils kann außerdem das freie Elektronenpaar des Stickstoffes nicht mehr für den intramolekularen Angriff auf die Oxoesterbindung zur Verfügung stehen (siehe Abb. 6.5A).



**Abb. 6.5: Schematische Darstellung der  $\beta$ -Amino-Heptapeptidyl-O-Ser Zwischenstufe innerhalb der aktiven Tasche der Srf-TE oder der Srf-TE(A81S)-Mutante:** A) Das protonierte Acyl-O-TE Intermediat ist nicht in der Lage, die Oxoesterbindung nukleophil anzugreifen und dadurch das zyklische Makrolaktam auszubilden. B) In der Srf-TE(A81S)-Mutante kann das Substrat-Nukleophil durch die zusätzliche Hydroxyl-Funktion des Serin81 eine Wasserstoff-Brücke aufbauen, die eine Deprotonierung des Nukleophils unterstützt.

Durch einen multiplen Sequenzvergleich verschiedener Zyklasen sollte herausgefunden werden, ob in der aktiven Tasche ein struktureller Unterschied zwischen den  $\text{TE}_{\text{Lakton}}$  und  $\text{TE}_{\text{Laktam}}$  zu finden ist, der eine bessere Positionierung und günstigeren Wechselwirkungen einer protonierten Amino-Spezies zulässt. Die Analyse ergab tatsächlich, dass  $\text{TE}_{\text{Laktam}}$  in ihrem Konsensus-Motiv (GxSxG) eine zusätzliche Hydroxyl-Funktion durch den Einbau eines Serins *downstream* zum aktiven Serin aufweist. In der Klasse der  $\text{TE}_{\text{Lakton}}$  ist diese Position meist durch eine

kurze aliphatische Aminosäure-Seitenkette gekennzeichnet (siehe Abb. 6.6). Diese zusätzliche Hydroxyl-Funktion könnte ein Grund für eine bessere Positionierung des Substrat-Nukleophils innerhalb der aktiven Tasche sein und durch die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoff-Brücke die Nukleophilie der Aminofunktion erhöhen (siehe Abb. 6.5B). Zur Überprüfung dieser These wurde an Position 81 innerhalb der Srf-TE durch eine Mutagenese-Strategie ein Serin eingebaut. Diese erhaltene Mutante Srf-TE(A81S) war erstaunlicherweise in der Lage, das angebotene Substrat  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  zum zyklischen Makrolaktam Surfactam umzusetzen.

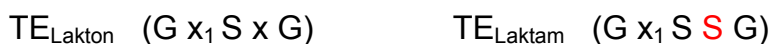
	I	Q	P	E	G	P	Y	V	L	L	G	Y	S	L	G	G	N	L	A	F	Majorität	
68	L	Q	P	E	G	P	L	T	L	F	G	Y	S	A	G	C	S	L	A	F	Srf-TE	Zyklisches Laktam
150	I	Q	P	E	G	P	Y	V	L	L	G	Y	S	A	G	G	N	L	A	F	Fen-TE	
75	Q	Q	P	H	G	P	Y	Y	L	L	G	Y	S	L	G	G	T	L	A	Q	EntF-TE	
81	V	Q	P	K	G	P	Y	H	L	L	G	W	S	L	G	G	N	V	V	Q	DhbF-TE	
108	L	C	P	D	G	P	Y	R	L	L	G	W	S	F	G	G	T	V	A	H	Dap-TE	
107	V	R	P	H	G	P	Y	R	L	L	G	W	S	L	G	A	H	V	A	H	A54-TE	
108	T	Q	P	E	G	P	Y	R	L	L	G	W	S	L	G	G	N	V	A	F	CDA-TE	
84	V	Q	P	K	G	P	Y	R	I	G	G	W	S	A	G	G	L	I	A	Y	Syr-TE	
82	T	V	P	E	G	P	Y	E	I	L	G	W	S	F	G	G	L	V	A	H	Prs-TE	
387	T	Q	S	D	G	Q	Y	V	L	I	G	Y	S	S	G	G	N	L	A	F	Grs-TE	Zyklisches Laktam
273	I	D	P	S	G	P	Y	T	L	M	G	Y	S	S	G	G	N	L	A	F	Tyc-TE	
150	I	Q	G	E	G	P	Y	T	L	I	G	Y	S	S	G	G	I	L	A	F	Bac-TE	
82	I	Q	E	Q	G	P	F	V	L	L	G	Y	S	S	G	S	N	L	A	F	Itu-TE	
84	I	Q	E	Q	G	P	F	V	L	L	G	Y	S	S	G	S	N	L	A	F	Myc-TE	
82	L	H	P	D	R	P	F	V	L	F	G	H	S	M	G	G	M	V	A	F	Srf-TEII	

**Abb. 6.6: Multiples Sequenz-Alignment verschiedener NRPS-Zyklus:** Eindeutig ist innerhalb der GxSxG Konsensus-Region der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ein Sequenz-Muster zu erkennen. In der Klasse der  $\text{TE}_{\text{Laktam}}$  ist die Position *downstream* des aktiven Serins durch eine aliphatische Seitenkette gekennzeichnet, während in den  $\text{TE}_{\text{Laktam}}$  sich an dieser Position eine zusätzliche Hydroxyl-Funktion durch Integration eines Serins befindet. Zur Verdeutlichung ist in der letzten Zeile die Sequenz der Srf-TEII dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen die erste rationale Veränderung einer  $\text{TE}_{\text{Laktam}}$ , in der mit Hilfe der Substitution einer einzelnen Aminosäure eine Makrolaktam-Bildung induziert werden konnte. Eindrucksvoll konnte der Einfluss einer zusätzlichen Hydroxyl-Funktion innerhalb der aktiven Taschen der Surfactin-Zyklase für eine Makrolaktam-Bildung gezeigt werden. Dieses wirft die Frage auf, ob diese zusätzliche Wasserstoff-Brücke in der Ausbildung des Übergangszustandes ausreichend ist, die neuen katalytischen Eigenschaften des Enzyms zu erklären? <sup>[157]</sup> Zur Beantwortung dieser Frage wurde nach weiteren Beispielen gesucht, in denen

die Veränderung einer Wasserstoff-Brücke Auswirkung auf die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms hatte. Ein solches Beispiel stellt die Ketosteroid-Isomerase da.<sup>[158]</sup> Dieses Enzym, das die Isomerisierung eines 5,6-ungesättigten Ketosteroids in das korrespondierende 4,5-ungesättigte Isomer katalysiert, ist bei dieser katalytischen Reaktion ganz wesentlich auf die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken angewiesen. Die Aufhebung nur einer Wasserstoffbrücke innerhalb der aktiven Tasche, die zwischen Substrat und Enzym ausgebildet wird, führt dabei schon zu einem drastischen Abfall der Substrat-Solvatisierung und zu deutlich geringeren Produktausbeuten.

Interessanterweise ist die in der Srf-TE identifizierte Aminosäure eine an der Ausbildung der Oxyanionbindungstasche beteiligte Aminosäure. Die Funktion der daran beteiligten Aminosäuren-Seitenketten konnten in Lipasen für deren Aktivität gegenüber tertiären Alkoholen geklärt werden.<sup>[159]</sup> Durch die unmittelbare Nähe zum Oxoester werden diesen Seitenketten-Funktionen zentrale Bedeutung für die enzymatische Katalyse von  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen und dadurch auch in NRPS Zyklen zugeschrieben.<sup>[160, 161]</sup> Im Falle der Srf-TE konnte die zusätzliche Hydroxyl-Funktion des Serins den richtigen chemischen Zustand und die richtige Positionierung des Substrates innerhalb der aktiven Tasche gewährleisten und ermöglichte die Katalyse einer völlig neuen Reaktion. Interessanterweise konnte auch durch die Einführung eines zusätzlichen Protonendonors (Glu<sub>19</sub>) in die Position einer Oxyanion-Aminosäure der Cystein-Protease diese durch eine einzelne Aminosäure-Substitution mit einer Nitril-Hydrat-Aktivität ausgestattet werden.<sup>[162]</sup> Durch die erzielten Ergebnisse lässt sich eine entscheidende Bedeutung der Oxyanion-Aminosäuren für die katalysierte Reaktion der NRPS-Zyklen folgern und diese durch ihr Konsensus-Muster wie folgt klassifizieren:



In Position  $x_1$  handelt es sich dabei meist um eine aromatische Aminosäure mit Ausnahmen der NRPS TEII, die an dieser Stelle ein konserviertes Histidin tragen. Trotz der Veränderung dieser Schlüssel-Aminosäure Position konnte die katalytische Effizienz der Zyklisierungsreaktion mit einem Umsatz von 0,5% des Substrates in das zyklische Surfactam noch kein zufriedenstellendes Ergebnis liefern. Der grösste

Anteil des Substrates wird immer noch durch die Hydrolyse des Oxoesters in die freie Peptidsäure umgesetzt. Um die katalytische Effizienz und damit die zyklische Surfactam-Ausbeute zu erhöhen, müsste durch einen weiteren zufälligen Mutageneseschritt die entwickelte Mutante Srf-TE(A81S) weiter in Richtung auf das angebotene Substrat optimiert werden. Die Substitution einer bis jetzt unbekannten Aminosäuren durch eine ungerichtete Mutagenese könnte Mutanten entstehen lassen, die in der Lage wären, die gewünschte zyklische Laktambildung mit einer erhöhten katalytischen Effizienz zu katalysieren.

#### 6.3.4 Der Einfluss der Abgangsgruppe auf die Surfactam-Bildung

Die im Laufe meiner Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass durch die Wahl der reaktiveren Thiophenol-Gruppe am C-Terminus des NH<sub>2</sub>-SLP-Substrates eine 20-fach höhere zyklische Surfactam-Ausbeute durch die Srf-TE(A81S)-Mutante möglich war. Eine Erhöhung der Substrat-Nukleophilie durch die Abgangsgruppe kann dabei ausgeschlossen werden, da das ausgebildete Acyl-O-TE Intermediat völlig identisch mit dem des SNAC-Substrates ist. Da das lineare Surfactin-Substrat bei Inkubation ohne das Enzym keine spontane Autozyklisierung zeigt, spricht dieses Verhalten dafür, dass es nur einer geringen Vorfaltung in Lösung unterliegt. Während der Inkubation mit der Srf-TE(A81S)-Mutante diffundiert das Substrat in die aktive Tasche der Zyklase und wird dort durch Wechselwirkungen mit den vorliegenden Aminosäuren in die richtige Position gebracht, die eine Acylierung des Serins ermöglicht. Die Thiophenol-Abgangsgruppe hat verglichen mit der SNAC-Abgangsgruppe, ein höheres Gruppenübertragungspotential. Es ist also denkbar, dass schon während der Positionierung des Peptides in der aktiven Tasche, das intramolekulare Nukleophil und der C-Terminus des Peptides sich so nahe kommen, dass eine Zyklisierung ermöglicht wird. Diese Autozyklisierung wird ebenfalls bei vorgefalteten Peptidyl-Thiophenol-Substraten, wie in Kapitel 6.1.3 beschrieben, häufig beobachtet.<sup>[96]</sup> Im Falle des NH<sub>2</sub>-SLP-Thiophenol Substrates ist allerdings die strukturgebende aktive Tasche nötig, um diese Autozyklisierung zu ermöglichen. Dabei könnten die katalytisch wichtigen Aminosäuren innerhalb der aktiven Taschen eine zusätzliche Stabilisierung des Substrates bewirken, wie dieses auch für den Reaktionsmechanismus der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen C-C-Hydrolase und Hydroxynitril-Lyase postuliert wird.<sup>[163]</sup> Die Srf-TE-Mutante würde daher eher als Peptid-Chaperon

fungieren, als dass sie durch ihren katalytischen Mechanismus eine Zyklisierung ermöglicht. Die Bedeutung der zusätzlichen Wasserstoffbrücke für die Deprotonierung des Substrates wird auch hierbei deutlich, da eine Inkubation mit dem Wild-Typ Enzym Srf-TE diese Autozyklisierung nicht, oder nur in sehr geringen Mengen zulässt. Eine weitere interessante Analyse des Reaktionsprofils ergibt sich daraus, dass trotz der erhöhten Zyklisierungsrate weiterhin Hydrolyse des Acyl-O-TE Oxoesters zu beobachten ist, woraus sich eine partielle Acylierung des Serins der Zyklase ableiten lässt. Da das ausgebildete Acyl-O-TE Intermediat beider Substrate,  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  und  $\text{NH}_2\text{-SLP-Thiophenol}$  gleich ist, müsste es mit der gleichen Geschwindigkeit zyklisiert werden und diese enzymatische Zyklisierung nur im Falle des reaktiveren Thiophenol-Substrates in kinetischer Konkurrenz mit einer Autozyklisierung des Peptides in der aktiven Tasche stehen. Da die spontane Zyklisierung des Substrates  $\text{NH}_2\text{-SLP-SNAC}$  durch dessen niedrigeres Gruppenübertragungspotential nicht möglich ist, könnte durch diese Annahme die erhöhten Ausbeuten der zyklischen Surfactam-Bildung des Thiophenol-Substrates erklärt werden. Gegenstand momentaner Untersuchungen ist die Frage, ob eine Inaktivierung des katalytischen Serins (Mutagenese zum Alanin) in der Srf-TE(A81S)-Mutante einen Aufschluss über diese Chaperon-Eigenschaften der Srf-TE ergeben kann.

### 6.3.5 Die Perspektive chemoenzymatischer Zyklisierungsreaktionen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die chemoenzymatische Zyklisierung einen einfachen und schnellen Ansatz für die Produktion zyklischer Peptide und deren Derivate darstellt. Es konnte belegt werden, dass die optimale Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche der Zyklase essentiell für eine zufriedenstellende Produktausbeute ist. Eine Veränderung des authentischen Substrates um Derivatisierung der vorkommenden zyklischen Peptide zu generieren, führt immer zu einer erhöhten Nebenproduktbildung und dadurch zu schlechteren Ausbeuten. In der Zukunft könnte eine Kombination der rationalen Veränderung von katalytisch wichtigen Aminosäuren und einer anschließenden Optimierung durch einen *in vitro* Evolutionsansatz der effektivste Weg sein, die Zyklisierungsreaktion so zu manipulieren, dass sie eine effizientere Produktion gewünschter zyklischer Produkte erzeugt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen können einen substantiellen Beitrag für die biotechnologische Anwendung der chemo-

enzymatischen Synthese zyklischer Naturstoffe und eine effizientere Substratnutzung gewährleisten und liefern Informationen, mit denen NRPS-Zyklasten gezielt auf eine gewünschte Reaktionskatalyse hin verändert werden können. Ein weiteres Verständnis der molekularen Grundlagen der Bindungsknüpfung in NRPS-Zyklasten wäre nötig, um eine breitere Substrat-Spezifität in den Enzymen zu erzeugen und deren katalysierte Reaktionen stärker zu manipulieren. Auch ein besseres molekulares Verständnis der Kommunikation und Interaktion der Zyklasten mit ihren angrenzenden PCP-Domänen wäre hilfreich, um einen breiteren kombinatorischen Ansatz für diese spezifischen molekularen Werkzeuge zu schaffen. Durch die Möglichkeit der relativ unspezifischen Beladung der PCP-Domäne, die mit vielen CoA-gekoppelten Peptiden beladen werden können, wäre es möglich, *in trans* katalysierende Modifikationsenzyme zu verwenden, um spezifische Reaktionen von PCP gebundenen Peptiden zu katalysieren und diese anschließend entweder durch Zyklasten zu zyklisieren oder den Thioester hydrolytisch zu spalten um das modifizierte Peptid freizusetzen.





## 7 Literatur

1. Mootz, H.D., Schwarzer, D., and Marahiel, M.A. (2002). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* 3, 490-504.
2. Fischbach, M.A., and Walsh, C.T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev* 106, 3468-3496.
3. Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M.A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* 20, 275-287.
4. Konz, D., and Marahiel, M.A. (1999). How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* 6, R39-48.
5. Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A., and Patel, H.M. (2001). Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* 5, 525-534.
6. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347, 203-206.
7. von Dohren, H., Keller, U., Vater, J., and Zocher, R. (1997). Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem Rev* 97, 2675-2706.
8. Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 6, 493-505.
9. Eppelmann, K., Stachelhaus, T., and Marahiel, M.A. (2002). Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* 41, 9718-9726.
10. May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., and Stubbs, M.T. (2002). Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12120-12125.
11. Belshaw, P.J., Walsh, C.T., and Stachelhaus, T. (1999). Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* 284, 486-489.
12. Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T., and Keating, A.E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* 9, 522-526.
13. Roche, E.D., and Walsh, C.T. (2003). Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis. *Biochemistry* 42, 1334-1344.
14. Balibar, C.J., Vaillancourt, F.H., and Walsh, C.T. (2005). Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem Biol* 12, 1189-1200.
15. Stachelhaus, T., Huser, A., and Marahiel, M.A. (1996). Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* 3, 913-921.

16. Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C.T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* 3, 923-936.
17. Koglin, A., Mofid, M.R., Lohr, F., Schafer, B., Rogov, V.V., Blum, M.M., Mittag, T., Marahiel, M.A., Bernhard, F., and Dotsch, V. (2006). Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *Science* 312, 273-276.
18. Schneider, A., and Marahiel, M.A. (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* 169, 404-410.
19. Sieber, S.A., and Marahiel, M.A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* 105, 715-738.
20. Pazirandeh, M., Chirala, S.S., Huang, W.Y., and Wakil, S.J. (1989). Characterization of recombinant thioesterase and acyl carrier protein domains of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264, 18195-18201.
21. Chakravarty, B., Gu, Z., Chirala, S.S., Wakil, S.J., and Quiocho, F.A. (2004). Human fatty acid synthase: structure and substrate selectivity of the thioesterase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15567-15572.
22. Grunewald, J., and Marahiel, M.A. (2006). Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 121-146.
23. Chiu, H.T., Hubbard, B.K., Shah, A.N., Eide, J., Fredenburg, R.A., Walsh, C.T., and Khosla, C. (2001). Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8548-8553.
24. Miller, D.A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T.A., and Walsh, C.T. (2002). Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* 9, 333-344.
25. Weber, G., and Leitner, E. (1994). Disruption of the cyclosporin synthetase gene of *Tolypocladium niveum*. *Curr Genet* 26, 461-467.
26. Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U., and Marahiel, M.A. (2004). The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem* 279, 7413-7419.
27. Becker, J.E., Moore, R.E., and Moore, B.S. (2004). Cloning, sequencing, and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization. *Gene* 325, 35-42.
28. Gaitatzis, N., Kunze, B., and Muller, R. (2005). Novel insights into siderophore formation in myxobacteria. *Chembiochem* 6, 365-374.
29. Magarvey, N.A., Haltli, B., He, M., Greenstein, M., and Hucul, J.A. (2006). Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drug-resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2167-2177.
30. Stachelhaus, T., and Walsh, C.T. (2000). Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry* 39, 5775-5787.

31. Hahn, M., and Stachelhaus, T. (2004). Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15585-15590.
32. Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N., and Keller, U. (2000). Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem Biol* *7*, 287-297.
33. Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H., and Walsh, C.T. (1998). Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* *5*, 631-645.
34. Miller, D.A., and Walsh, C.T. (2001). Yersiniabactin synthetase: probing the recognition of carrier protein domains by the catalytic heterocyclization domains, Cy1 and Cy2, in the chain-initiating HWMP2 subunit. *Biochemistry* *40*, 5313-5321.
35. Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Hofle, G., Beyer, S., and Muller, R. (1999). New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem* *274*, 37391-37399.
36. Reimann, C., Serino, L., Beyeler, M., and Haas, D. (1998). Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the *pchEF* genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* *144* ( Pt 11), 3135-3148.
37. Reimann, C., Patel, H.M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C.T., and Haas, D. (2001). Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* *183*, 813-820.
38. Schoenafinger, G., Schracke, N., Linne, U., and Marahiel, M.A. (2006). Formylation domain: an essential modifying enzyme for the nonribosomal biosynthesis of linear gramicidin. *J Am Chem Soc* *128*, 7406-7407.
39. Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiainen, H., Buikema, W., Haselkorn, R., and Sivonen, K. (2000). Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol* *37*, 156-167.
40. van Wageningen, A.M., Kirkpatrick, P.N., Williams, D.H., Harris, B.R., Kershaw, J.K., Lennard, N.J., Jones, M., Jones, S.J., and Solenberg, P.J. (1998). Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol* *5*, 155-162.
41. Losey, H.C., Peczu, M.W., Chen, Z., Eggert, U.S., Dong, S.D., Pelczar, I., Kahne, D., and Walsh, C.T. (2001). Tandem action of glycosyltransferases in the maturation of vancomycin and teicoplanin aglycones: novel glycopeptides. *Biochemistry* *40*, 4745-4755.
42. Stegmann, E., Pelzer, S., Bischoff, D., Puk, O., Stockert, S., Butz, D., Zerbe, K., Robinson, J., Sussmuth, R.D., and Wohlleben, W. (2006). Genetic analysis of the balhimycin (vancomycin-type) oxygenase genes. *J Biotechnol* *124*, 640-653.
43. Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., and van Sinderen, D. (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *8*, 821-831.

44. Trivedi, O.A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2004). Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* **428**, 441-445.
45. Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., and Vater, J. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13294-13299.
46. Aron, Z.D., Dorrestein, P.C., Blackhall, J.R., Kelleher, N.L., and Walsh, C.T. (2005). Characterization of a new tailoring domain in polyketide biogenesis: the amine transferase domain of MycA in the mycosubtilin gene cluster. *J Am Chem Soc* **127**, 14986-14987.
47. Crosa, J.H., and Walsh, C.T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 223-249.
48. König, G.M., Kehraus, S., Seibert, S.F., Abdel-Lateff, A., and Müller, D. (2006). Natural products from marine organisms and their associated microbes. *Chembiochem* **7**, 229-238.
49. Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., and Marahiel, M.A. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol* **4**, 927-937.
50. Ming, L.J., and Epperson, J.D. (2002). Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem* **91**, 46-58.
51. Keating, T.A., Marshall, C.G., and Walsh, C.T. (2000). Vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH is an amide synthase homologous to nonribosomal peptide synthetase condensation domains. *Biochemistry* **39**, 15513-15521.
52. Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., and Howard-Jones, A.R. (2006). Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery. *Nat Prod Rep* **23**, 517-531.
53. Garneau-Tsodikova, S., Stapon, A., Kahne, D., and Walsh, C.T. (2006). Installation of the pyrrolyl-2-carboxyl pharmacophore by CouN1 and CouN7 in the late biosynthetic steps of the aminocoumarin antibiotics clorobiocin and coumermycin A1. *Biochemistry* **45**, 8568-8578.
54. Tseng, C.C., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., and Sieber, S.A. (2002). Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* **41**, 13350-13359.
55. Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., and Jung, G. (1986). Fengycin--a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiot (Tokyo)* **39**, 888-901.
56. Sieber, S.A., Walsh, C.T., and Marahiel, M.A. (2003). Loading peptidyl-coenzyme A onto peptidyl carrier proteins: a novel approach in characterizing macrocyclization by thioesterase domains. *J Am Chem Soc* **125**, 10862-10866.
57. Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A., and Walsh, C.T. (2000). Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **407**, 215-218.
58. Aron, Z.D. (2006). Persönliche Mitteilung.

59. Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., and Walsh, C.T. (2001). Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **40**, 7099-7108.
60. Hoyer, K., Mahlert, C., and Marahiel, M.A. (2006). The Iterative Gramicidin S Thioesterase (TE) Catalyzes Peptide Ligation and Cyclization. *Chem Biol* *submitted*.
61. May, J.J., Wendrich, T.M., and Marahiel, M.A. (2001). The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* **276**, 7209-7217.
62. Miethke, M., Klotz, O., Linne, U., May, J.J., Beckering, C.L., and Marahiel, M.A. (2006). Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*.
63. Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., and Stubbs, M.T. (2002). Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **10**, 301-310.
64. Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A., and Essen, L.O. (2006). The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J Mol Biol* **359**, 876-889.
65. Nardini, M., and Dijkstra, B.W. (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 732-737.
66. Holmquist, M. (2000). Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* **1**, 209-235.
67. Blow, D.M., Birktoft, J.J., and Hartley, B.S. (1969). Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**, 337-340.
68. Fischer, M., and Pleiss, J. (2003). The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res* **31**, 319-321.
69. Pazirandeh, M., Chirala, S.S., and Wakil, S.J. (1991). Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**, 20946-20952.
70. Morris, M. (1994). Primary structural confirmation of components of the bacitracin complex. *Biol Mass Spectrom* **23**, 61-70.
71. Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K., and Campos-Takaki, G.M. (1993). Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* **42**, 1-7.
72. Ishihara, H., and Shimura, K. (1979). Thiazoline ring formation in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett* **99**, 109-112.
73. Ishihara, H., and Shimura, K. (1988). Further evidence for the presence of a thiazoline ring in the isoleucylcysteine dipeptide intermediate in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett* **226**, 319-323.
74. Higashi, Y., Siewert, G., and Strominger, J.L. (1970). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIX. Isoprenoid alcohol phosphokinase. *J Biol Chem* **245**, 3683-3690.
75. Stone, K.J., and Strominger, J.L. (1971). Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 3223-3227.

76. Storm, D.R., and Strominger, J.L. (1973). Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J Biol Chem* 248, 3940-3945.
77. Makinen, K.K. (1972). Inhibition by bacitracin of some hydrolytic enzymes. *Int J Protein Res* 4, 21-28.
78. Rieber, M., Imaeda, T., and Cesari, I.M. (1969). Bacitracin action on membranes of mycobacteria. *J Gen Microbiol* 55, 155-159.
79. Schechter, N., Momose, K., and Rudney, H. (1972). The effect of bacitracin and  $\text{Ca}^{++}$  on the formation of polyprenylpyrophosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. *Biochem Biophys Res Commun* 48, 833-839.
80. Pfeffer-Hennig, S., Dauter, Z., Hennig, M., Hohne, W., Wilson, K., and Betzel, C. (1996). Three dimensional structure of the antibiotic bacitracin A complexed to two different subtilisin proteases: novel mode of enzyme inhibition. *Adv Exp Med Biol* 379, 29-41.
81. Toscano, W.A., Jr., and Storm, D.R. (1982). Bacitracin. *Pharmacol Ther* 16, 199-210.
82. Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol* 10, 208-217.
83. Maget-Dana, R., and Peypoux, F. (1994). Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87, 151-174.
84. Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* 31, 488-494.
85. Konz, D., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J Bacteriol* 181, 133-140.
86. Nishikiori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., and Umezawa, H. (1986). Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. III. Structural elucidation of plipastatins. *J Antibiot (Tokyo)* 39, 755-761.
87. Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 495-508.
88. Desai, J.D., and Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 47-64.
89. Singh, P., and Cameotra, S.S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol* 22, 142-146.
90. Bernheimer, A.W., and Avigad, L.S. (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 61, 361-369.
91. Woodward, R.B., Logusch, E., Nambiar, K.P., Sakan, K., Ward, D.E., Au-Yeung, B.W., Balaram, P., Browne, L.J., Card, P.J., and Chen, C.H. (1981). Asymmetric total synthesis of erythromycin. 3. Total synthesis of erythromycin. *J Am Chem Soc* 103, 3215-3217.
92. Davies, J.S. (2003). The cyclization of peptides and depsipeptides. *J Pept Sci* 9, 471-501.
93. Kohli, R.M., and Walsh, C.T. (2003). Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chem Commun (Camb)*, 297-307.

94. Kohli, R.M., Walsh, C.T., and Burkart, M.D. (2002). Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature* **418**, 658-661.
95. Lin, H., Thayer, D.A., Wong, C.H., and Walsh, C.T. (2004). Macrolactamization of glycosylated peptide thioesters by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Chem Biol* **11**, 1635-1642.
96. Sieber, S.A., Tao, J., Walsh, C.T., and Marahiel, M.A. (2004). Peptidyl thiophenols as substrates for nonribosomal peptide cyclases. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 493-498.
97. Lorenz, P., and Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* **3**, 510-516.
98. Liese, A., Seelbach, K., and Wandrey, C. (2000). *Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim.
99. Reetz, M.T., Bocola, M., Carballeira, J.D., Zha, D., and Vogel, A. (2005). Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 4192-4196.
100. Carrea, G., and Riva, S. (2000). Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 2226-2254.
101. Chakrabarti, R., Klibanov, A.M., and Friesner, R.A. (2005). Sequence optimization and designability of enzyme active sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12035-12040.
102. Li, H., Helling, R., Tang, C., and Wingreen, N. (1996). Emergence of preferred structures in a simple model of protein folding. *Science* **273**, 666-669.
103. Fischer, E. (1894). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **27**, 1985-2036.
104. Fersht, A. (1997). *Structure and Mechanism in Protein Science*. Freeman, New York.
105. Copley, S.D. (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 265-272.
106. O'Brien, P.J., and Herschlag, D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem Biol* **6**, R91-R105.
107. Baird, T.T., Jr., Wright, W.D., and Craik, C.S. (2006). Conversion of trypsin to a functional threonine protease. *Protein Sci* **15**, 1229-1238.
108. Zaks, A., and Klibanov, A.M. (1988). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J Biol Chem* **263**, 3194-3201.
109. Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241-246.
110. Hudson, E.P., Eppler, R.K., and Clark, D.S. (2005). Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 637-643.
111. Mesiano, A.J., Beckman, E.J., and Russell, A.J. (1999). Supercritical Biocatalysis. *Chem Rev* **99**, 623-634.
112. Saul, S., Corr, S., and Micklefield, J. (2004). Biotransformations in low-boiling hydrofluorocarbon solvents. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 5519-5523.
113. Mesiano, A.J., Beckman, E.J., and Russell, A.J. (2000). Biocatalytic synthesis of fluorinated polyesters. *Biotechnol Prog* **16**, 64-68.



114. Kragl, U., Eckstein, M., and Kaftzik, N. (2002). Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol* 13, 565-571.
115. Park, S., and Kazlauskas, R.J. (2003). Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology. *Curr Opin Biotechnol* 14, 432-437.
116. Erbelinger, M., Mesiano, A.J., and Russell, A.J. (2000). Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol Prog* 16, 1129-1131.
117. Farabough, P.J. (1978). Sequence of the *lacI* gene. *Nature* 274, 765-769.
118. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
119. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
120. Bennett, J., and Scott, K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* 43, 173-182.
121. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
122. Merrifield, R.B. (1964). Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry* 3, 1385-1390.
123. Merrifield, B. (1997). Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol* 289, 3-13.
124. Nozaki, S., and Muramatsu, I. (1988). Convenient Synthesis of N-Protected Amino Acid Amides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 61, 2647-2648.
125. North, M., and Pattenden, G. (1990). Synthetic studies towards cyclic peptides. Concise synthesis of thiazoline and thiazole containing amino acids. *Tetrahedron* 46, 8267-8290.
126. Lee, J., Griffin, J.H., and Nicas, T.I. (1996). Solid-Phase Total Synthesis of Bacitracin A. *J Org Chem* 61, 3983-3986.
127. Williams, D.R., Lowder, P.D., Gu, Y.G., and Brook, D.A. (1997). Studies of mild dehydrogenations in heterocyclic systems. *Tetrahedron Letter* 38, 331-334.
128. Nicolaou, K.C., Chen, D.Y., Huang, X., Ling, T., Bella, M., and Snyder, S.A. (2004). Chemistry and biology of diazonamide A: first total synthesis and confirmation of the true structure. *J Am Chem Soc* 126, 12888-12896.
129. Phillips, A.J.U., Y., Wipf, P.; Reno, M. J.; Williams, D. R. (2000). Synthesis of Functionalized Oxazolines and Oxazoles with DAST and Deoxo-Fluor. *Org. Lett.* 2, 1165-1168.
130. Downing, S.V., Aguilar, E., and Meyers, A.I. (1999). Total Synthesis of Bistratamide D. *J Org Chem* 64, 826-831.
131. Pittenauer, E., Zehl, M., Belgacem, O., Raptakis, E., Mistrik, R., and Allmaier, G. (2006). Comparison of CID spectra of singly charged polypeptide antibiotic precursor ions obtained by positive-ion vacuum MALDI IT/TOF and TOF/TOF, AP-MALDI-IT and ESI-IT mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 41, 421-447.

132. Yeh, E., Lin, H., Clugston, S.L., Kohli, R.M., and Walsh, C.T. (2004). Enhanced macrocyclizing activity of the thioesterase from tyrocidine synthetase in presence of nonionic detergent. *Chem Biol* 11, 1573-1582.
133. Trauger, J.W., Kohli, R.M., and Walsh, C.T. (2001). Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098.
134. Grunewald, J., Sieber, S.A., and Marahiel, M.A. (2004). Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: the recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry* 43, 2915-2925.
135. Nicholas, G.M., and Phillips, A.J. (2005). Marine natural products: synthetic aspects. *Nat Prod Rep* 22, 144-161.
136. van Rantwijk, F., Madeira Lau, R., and Sheldon, R.A. (2003). Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol* 21, 131-138.
137. Bornscheuer, U.T., and Kazlauskas, R.J. (2004). Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 6032-6040.
138. Wu, T.K., Liu, Y.T., Chang, C.H., Yu, M.T., and Wang, H.J. (2006). Site-saturated mutagenesis of histidine 234 of *saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase demonstrates dual functions in cyclization and rearrangement reactions. *J Am Chem Soc* 128, 6414-6419.
139. Dugi, K.A., Dichak, H.L., and Santamarina-Fojo, S. (1995). Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J Biol Chem* 270, 25396-25401.
140. Zaks, A., and Klibanov, A.M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science* 224, 1249-1251.
141. Mukhtar, T.A., Koteva, K.P., and Wright, G.D. (2005). Chimeric streptogramin-tyrocidine antibiotics that overcome streptogramin resistance. *Chem Biol* 12, 229-235.
142. Grunewald, J., Sieber, S.A., Mahler, C., Linne, U., and Marahiel, M.A. (2004). Synthesis and derivatization of daptomycin: a chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics. *J Am Chem Soc* 126, 17025-17031.
143. Bu, X., Wu, X., Ng, N.L., Mak, C.K., Qin, C., and Guo, Z. (2004). Synthesis of gramicidin S and its analogues via an on-resin macrolactamization assisted by a predisposed conformation of the linear precursors. *J Org Chem* 69, 2681-2685.
144. Bu, X., Wu, X., Xie, G., and Guo, Z. (2002). Synthesis of tyrocidine A and its analogues by spontaneous cyclization in aqueous solution. *Org Lett* 4, 2893-2895.
145. Kopp, F. (2006). Persönliche Mitteilung.
146. Boddy, C.N., Schneider, T.L., Hotta, K., Walsh, C.T., and Khosla, C. (2003). Epothilone C macrolactonization and hydrolysis are catalyzed by the isolated thioesterase domain of epothilone polyketide synthase. *J Am Chem Soc* 125, 3428-3429.
147. Zaks, A., and Klibanov, A.M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3192-3196.

148. Klibanov, A.M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol* 15, 97-101.
149. Chen, K., and Arnold, F.H. (1993). Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5618-5622.
150. Barends, T.R., Polderman-Tijmes, J.J., Jekel, P.A., Williams, C., Wybenga, G., Janssen, D.B., and Dijkstra, B.W. (2006). *Acetobacter turbidans* alpha-amino acid ester hydrolase: how a single mutation improves an antibiotic-producing enzyme. *J Biol Chem* 281, 5804-5810.
151. Jestin, J.L., and Vichier-Guerre, S. (2005). How to broaden enzyme substrate specificity: strategies, implications and applications. *Res Microbiol* 156, 961-966.
152. Reetz, M.T., Carballeira, J.D., Peyralans, J., Hobenreich, H., Maichele, A., and Vogel, A. (2006). Expanding the Substrate Scope of Enzymes: Combining Mutations Obtained by CASTing. *Chemistry* 12, 6031-6038.
153. Schmidt, M., Hasenpusch, D., Kahler, M., Kirchner, U., Wiggenghorn, K., Langel, W., and Bornscheuer, U.T. (2006). Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *Chembiochem* 7, 805-809.
154. Witkowski, A., Witkowska, H.E., and Smith, S. (1994). Reengineering the specificity of a serine active-site enzyme. Two active-site mutations convert a hydrolase to a transferase. *J Biol Chem* 269, 379-383.
155. Schmidt, D.M., Mundorff, E.C., Dojka, M., Bermudez, E., Ness, J.E., Govindarajan, S., Babbitt, P.C., Minshall, J., and Gerlt, J.A. (2003). Evolutionary potential of (beta/alpha)<sub>8</sub>-barrels: functional promiscuity produced by single substitutions in the enolase superfamily. *Biochemistry* 42, 8387-8393.
156. Harris, T.K., and Turner, G.J. (2002). Structural basis of perturbed pK<sub>a</sub> values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* 53, 85-98.
157. Zheng, Y.J., and Bruice, T.C. (1997). Is strong hydrogen bonding in the transition state enough to account for the observed rate acceleration in a mutant of papain? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4285-4288.
158. Kraut, D.A., Sigala, P.A., Pybus, B., Liu, C.W., Ringe, D., Petsko, G.A., and Herschlag, D. (2006). Testing electrostatic complementarity in enzyme catalysis: hydrogen bonding in the ketosteroid isomerase oxyanion hole. *PLoS Biol* 4, e99.
159. Henke, E., Pleiss, J., and Bornscheuer, U.T. (2002). Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols: insights into structure-function relationships. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 3211-3213.
160. Rotticci, D., Rotticci-Mulder, J.C., Denman, S., Norin, T., and Hult, K. (2001). Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *Chembiochem* 2, 766-770.
161. Hirose, Y., Kariya, K., Nakanishi, Y., Kurono, Y., and Achiwa, K. (1995). Inversion of enantioselectivity in hydrolysis of 1,4-dihydropyridines by point mutation of lipase PK. *Tetrahedron Letter* 36, 1063-1066.

162. Dufour, E., Storer, A.C., and Menard, R. (1995). Engineering nitrile hydratase activity into a cysteine protease by a single mutation. *Biochemistry* 34, 16382-16388.
163. Bugg, T.D. (2004). Diverse catalytic activities in the alphabeta-hydrolase family of enzymes: activation of H<sub>2</sub>O, HCN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub>. *Bioorg Chem* 32, 367-375.



## 8 Anhang

### I ) Verwendete ionische Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeit	Chemische Bezeichnung
[BMIM]BF <sub>4</sub>	1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborat
[BMIM]CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>	1-Butyl-3-methylimidazolium Trifluoromethansulfonat
Ecoeng <sup>TM</sup> 41M	1-Butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy)ethylsulfat
Ecoeng <sup>TM</sup> 212	1-Ethyl-3-methylimidazolium Ethylsulfate
Ecoeng <sup>TM</sup> 1111P	1,3-Dimethylimidazolium Diethylphosphat
[4MBP]BF <sub>4</sub>	1-Butyl-4-Methylpyridinium Tetrafluoroborat
[OMA]BTA	Methyltrioctylammonium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imid
[EtOMIM]BTA	1-Ethoxy-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imid
[EtOHIM]BTA	1-Ethoxy-3-hexyllimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imid
[BMIM]BTA	1-Butyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imid
[EMIM]BTA	1-Ethyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imid
[HMIM]BTA	1-Hexyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imid

## II ) Peptidsequenzen

Peptid	Aminosäure-Sequenz
SLP <sub>WT</sub>	3( <i>R</i> )-OH-FS(C <sub>14</sub> )-Glu-Leu-DLeu-Val-Asp-DLeu-Leu
SLP	3( <i>R</i> )-OH-FS(C <sub>4</sub> )-Glu-Leu-DLeu-Val-Asp-DLeu-Leu
SLP <sub>3</sub>	3( <i>R</i> )-OH-FS(C <sub>4</sub> )-Glu-Leu-Ddap-Val-Asp-DLeu-Leu
NH <sub>2</sub> -SLP	3( <i>R</i> )-NH <sub>2</sub> -FS(C <sub>4</sub> )-Glu-Leu-DLeu-Val-Asp-DLeu-Leu
BLP-Thia <sub>2</sub>	Ile-Thiazolin-Leu-DGlu-Ile-Lys-DOrn-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-Thaz <sub>2</sub>	Ile-Thiazol-Leu-DGlu-Ile-Lys-DOrn-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-OxS <sub>2</sub>	Ile-Oxazol-Leu-DGlu-Ile-Lys-DOrn-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-OxT <sub>2</sub>	Ile-5Methyloxazol-Leu-DGlu-Ile-Lys-DOrn-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-Ala <sub>2</sub>	Ile-Ala-Leu-DGlu-Ile-Lys-DOrn-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-O <sub>7</sub> A	Ile-Ala-Leu-DGlu-Ile-Lys-DAla-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-K <sub>6</sub> A	Ile-Ala-Leu-DGlu-Ile-Ala-DOrn-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-K <sub>6</sub> A/O <sub>7</sub> A	Ile-Ala-Leu-DGlu-Ile-Ala-DAla-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-DLys <sub>6</sub>	Ile-Ala-Leu-DGlu-Ile-DLys-DAla-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-DAsn <sub>12</sub>	Ile-Ala-Leu-DGlu-Ile-Lys-DAla-Ile-DPhe-His-DAsp-DAsn
BLP-Hse <sub>6</sub>	Ile-Ala-Leu-DGlu-Ile-Hse-DAla-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn
BLP-7A <sub>7</sub>	Lys-DOrn-Ile-DPhe-His-DAsp-Asn

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Marahiel möchte ich für die Bereitstellung der interessanten Arbeitsthemen danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe, persönliche Stärken zu verbessern, aber auch Schwächen zu identifizieren, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit und meinem Verständnis wissenschaftlichen Arbeitens beigetragen. Er hat meine Ideen unterstützt und diese durch wissenschaftliche Kompetenz weiterentwickelt und in die Tat umgesetzt.

Herrn Prof. Dr. Essen möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Die intensiven wissenschaftlichen Gespräche und Konsultationen haben einen entscheidenden Anteil am Erfolg meiner Untersuchungen gehabt und ich möchte mich in diesem Zusammenhang ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Bordusa und Prof. Dr. Bornscheuer und Prof. Dr. Stubbs für intensive Gespräche bedanken, die meinen wissenschaftlichen Horizont erweitert haben.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Marahiel und deren Nachwuchsgruppen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Stephan Sieber, der mich in das Arbeitsthema eingeführt hat und meistens einen Lösungsansatz bei wissenschaftlichen Problemen beisteuerte. Dr. Uwe Linne möchte ich für die Hilfestellung bei allen analytischen Fragenstellungen danken. Dr. Jürgen May hat einen großen Beitrag zur Entstehung des Bacitracin-Projektes geliefert und konnte durch seine Beratung viele kleinere und größere Probleme lösen. Dirk Schumann möchte ich für die exzellente Unterstützung bei der organischen Synthese danken. Ein Dankeschön geht ebenfalls an Antje Schäfer, Gabriele Schimpf-Weiland und Katja Kräling für die technische Betreuung.

Thomas Kurpiers, Frank Wiegeshoff, Verena Senn, Oliver Klotz, Henning Seedorf, Thomas Strecker und Ulrich Ertelt möchte ich für die vielen Abende mit intensiven Gesprächen herzlich danken.

Besonderer Dank geht an Dr. Martin Hahn, Dr. Jan Grünewald und Christoph Mahlert für die schnelle und kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei dem DFG-Graduiertenkolleg „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ bedanken. Ebenfalls danken möchte ich der Firma Solvent Innovations für die großzügige Bereitstellung der ionischen Flüssigkeiten.

Mein größter Dank allerdings gebührt meiner Lebenspartnerin Cathrine, die mich durch ihre liebevolle Geduld und Stärke immer wieder ermutigt und aufbaut und in den vergangenen Jahren meinen Rückhalt und meine Kraft darstellt.





